

Die regulatorische Funktion von ULK1 in der humanen U-snrRNP-Biogenese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Schmitz
aus Neuss

Düsseldorf, März 2018

aus dem Institut für Molekulare Medizin I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

2. Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juni 2018

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter der Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, März 2018

Katharina Schmitz

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
1.1	Summary	8
2	EINLEITUNG	9
2.1	Spinale Muskelatrophie (SMA) – Untergang der Motoneurone	9
2.2	Spleißen – Reifung der messenger-RNA	11
2.2.1	Das Spleißosom – eine RNA-basierte katalytische Maschinerie	14
2.3	Posttranslationale Modifikationen – ein Überblick	17
2.3.1	PTM regulieren Protein-Protein-Interaktionen in der U-snRNP-Biogenese	18
2.3.2	Proteinphosphorylierung	18
2.3.3	Protein-Methylierung	22
3	ZIELSETZUNG	29
4	MATERIAL UND METHODEN	30
4.1	Material	30
4.1.1	Radiochemikalien	30
4.1.2	Chromatographische Matrices	30
4.1.3	Antikörper	31
4.1.4	Proteine	32
4.1.5	Enzyme	32
4.1.6	Molekulargewichts- und Längenstandards	32
4.1.7	Zelllinien und Mikroorganismen	33
4.1.8	Oligonukleotide	34
4.1.9	Plasmide	35
4.1.10	Plasmidkonstrukte	36
4.1.11	Weitere Materialien	36
4.1.12	Geräte	37
4.1.13	Puffer und Lösungen	38
4.2	Methoden	40
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	40
4.2.2	Zellbiologische Methoden	46
4.2.3	Biochemische Methoden	48
4.2.4	Immunologische und immunbiochemische Methoden	56
5	ERGEBNISSE	58
5.1	Der PRMT5-Komplex interagiert mit der Serin-Threonin-Kinase <i>Unc-51-like kinase 1</i> (ULK1)	58
5.2	ULK1, ULK2 und ULK3 phosphorylieren pICln <i>in vitro</i>	60
5.2.1	Charakterisierung der pICln-Phosphorylierung durch ULK1	62
5.3	Generierung eines ULK1-Knockdowns	64
5.4	ULK1 phosphoryliert pICln <i>in vivo</i>	66
5.5	Identifizierung der pICln-Phosphorylierungsstellen	67
5.6	Charakterisierung der ULK1-abhängigen Phosphorylierungsstellen in pICln	68
5.6.1	Einfluss der ULK1-Phosphorylierung auf den PRMT5-Komplex	69
5.6.2	Methylierung der Sm-Proteine in Abhängigkeit von pICln	70
5.6.3	Die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 inhibiert die Interaktion mit SmG	72
5.6.4	ULK1 reguliert die Stabilität des 6S-Komplexes	76
5.7	Eine Inhibition von ULK1 reduziert die spleißosomale Aktivität	78
5.8	Einfluss des ULK1-Knockdowns auf die Motoneuronenentwicklung im <i>D. rerio</i> -Embryo	80
6	DISKUSSION	84
6.1	Der PRMT5-Komplex als neuer Interaktionspartner der Serin-Threonin-Kinase <i>Unc-51-like kinase 1</i> (ULK1)	84
6.2	pICln als neues Phospho-Substrat der ULK-Familie	86
6.3	Der Einfluss von pICln auf die Methylierung der Sm-Proteine B, D1 und D3	87
6.4	Regulation der Stabilität des 6S-Komplexes und der spleißosomalen Aktivität durch die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln	89
6.5	ULK1 und pICln im Zebrafisch (<i>D. rerio</i>)	93

6.6	Abschlussdiskussion und Ausblick.....	95
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	107
9	TABELLENVERZEICHNIS	108
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	109
11	PUBLIKATIONEN.....	112
12	DANKSAGUNG	113
13	LEBENS LAUF.....	114

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Prä-mRNA-Spleißen wird in Eukaryoten durch das Spleißosom katalysiert. Dieser Multimegadalton-Komplex besteht aus mehreren *uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles* (U-snRNPs). Ein U-snRNP wird zusammengesetzt aus einer für das jeweilige U-snRNP spezifischen Uridin-snRNA, einem für alle U-snRNPs gemeinsamen Satz aus sieben Sm-Proteinen und weiteren Uridin-spezifischen Proteinen. Der Zusammenbau des Spleißosoms ist hoch reguliert durch posttranslationale Modifikationen wie Proteinmethylierung und -phosphorylierung. Dem *assembly chaperone* pICln kommt in diesem System eine besondere Schlüsselrolle zu, da es zum einen die Sm-Proteine für die Methylierung zur Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5) rekrutiert und zum anderen eine stabile Ringstruktur mit den Sm-Proteinen D1, D2, F, E und G bildet, wobei pICln mit SmD1 und SmG direkt interagiert. Letztere wird auch als 6S-Komplex bezeichnet und repräsentiert ein stabiles Zwischenprodukt, welches die Übertragung der Sm-Proteine auf den SMN-Komplex inhibiert. Der SMN-Komplex katalysiert in der späten Phase der U-snRNP-Biogenese den Transfer der Sm-Proteine auf die U-snRNA, um das reife U-snRNP zu bilden. Somit ist die Öffnung des 6S-Rings für die fortlaufende Biogenese-Reaktion essenziell. Der molekulare Mechanismus und die in diesen Vorgang involvierten regulatorischen Elemente waren bisher unerforscht.

Die Serin/Threonin-Kinase *Unc-51-like kinase 1* (ULK1) war bislang hauptsächlich in der Regulation der Autophagie bekannt, obwohl frühere Daten ihr zudem eine Rolle in der neuronalen Differenzierung und axonalen Elongation zugeschrieben haben. In der vorliegenden Arbeit konnte ULK1 als Regulator der U-snRNP-Biogenese identifiziert und charakterisiert werden. ULK1 interagiert mit dem Methylosom, bestehend aus PRMT5, dem Methylosom-Protein 50 (WD45) und pICln, wobei diese Interaktion unabhängig von der C-terminalen Domäne von ULK1 und unabhängig von der Autophagie erfolgt. ULK1 ist demnach Teil eines weiteren, 400–600 kDa großen, Autophagie-unabhängigen Komplexes *in vivo* und phosphoryliert darüber hinaus die Methylosom-Untereinheit pICln an den Serinen 193, 195 und 197 im C-terminalen Bereich. Infolgedessen wird die Stabilität des 6S-Komplexes durch eine verringerte Affinität von pICln zu SmG beeinflusst, wodurch sich die Ringstruktur öffnet. Die Inhibition von ULK1 resultiert in einer Akkumulation des 6S-Intermediats und gleichzeitiger Reduktion der spleißosomalen Aktivität.

Mit ULK1 konnte demnach der bislang unbekannte Faktor identifiziert werden, der durch Phosphorylierung von pICln den stabilen 6S-Ring auflöst und folglich die Synthese der U-snRNPs fundamental reguliert und stimuliert. In der spinalen Muskelatrophie (SMA), welche durch die Degeneration der α -Motoneurone im Rückenmark charakterisiert ist, sind durch Mutation im *SMN*-Gen die U-snRNP-Biogenese und das mRNA-Spleißen beeinträchtigt. In *D. rerio*-Embryos führt ein *Knockdown* sowohl von SMN, aber auch von pICln, zu einem SMA-Phänotyp. Möglicherweise spielt

neben SMN und pICln das Protein ULK1 in der spinalen Muskelatrophie ebenfalls eine entscheidende Rolle, so dass die Aktivierung dieser Kinase und die daraus resultierende Stimulation der U-snRNP-Biogenese über pICln einen potenziellen Ansatzpunkt zur Behandlung dieser neuromuskulären Erkrankung bietet.

1.1 Summary

Pre-mRNA splicing in eukaryotes is catalyzed by the spliceosome, a multimegadalton complex consisting of several uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles (U snRNPs). U snRNP particles are composed of a specific uridine snRNA for each U snRNP, a set of seven Sm proteins common to all U snRNPs and further uridine-specific proteins. The assembly of the spliceosome is highly regulated by post-translational modifications such as protein methylation and phosphorylation. In this system the assembly chaperone pICln plays a key role: it recruits the Sm proteins for methylation to the protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) and it also builds a stable ring structure with the Sm proteins D1, D2, F, E and G, in which pICln interacts directly with SmD1 and SmG. The latter is also known as the 6S complex and represents a stable intermediate which inhibits the transfer of Sm proteins to the SMN complex. In the late phase of the U snRNP assembly, the SMN complex catalyzes the transfer of the Sm proteins to the U snRNA to form the mature U snRNP. For the consecutive biogenesis reaction, the opening of the 6S ring is essential. The molecular mechanism and the regulatory elements involved in this process are so far unknown.

To date, the serine/threonine kinase Unc-51-like kinase 1 (ULK1) was mainly known for its involvement in the regulation of autophagy, although earlier data also attributed its role in neuronal differentiation and axonal elongation. In the present work, ULK1 could be identified and characterized as a regulator of U snRNP biogenesis. It could be shown that ULK1 interacts independently of its C-terminal domain with the methylosom, consisting of PRMT5, the methylosom protein 50 (WD45) and pICln. This interaction is independent of autophagy. ULK1 is therefore part of another, 400–600 kDa, autophagy-independent complex *in vivo* and furthermore phosphorylates the methylosom subunit pICln at the serines 193, 195 and 197 within the C-terminal region. As a result, the stability of the 6S complex is influenced by a reduced affinity of pICln to SmG and this leads to opening of the ring structure. Inhibition of ULK1 results in accumulation of the 6S intermediate and concomitant reduction in spliceosomal activity.

With ULK1 a so far unknown factor could be identified, which dissolves the stable 6S ring by phosphorylation of pICln and thus fundamentally regulates and stimulates the synthesis of U snRNPs. In spinal muscular atrophy (SMA), which is characterized by degeneration of the α motor neurons, mutation in the SMN gene impairs U snRNP biogenesis and mRNA splicing. In *D. rerio* embryos, a Knockdown of both SMN and pICln causes an SMA phenotype. In addition to SMN and pICln, the ULK1 protein may also play a critical role in spinal muscular atrophy. Hence, the activation of this kinase and the resulting stimulation of the U snRNP biogenesis via pICln provides a potential starting point for treating this neuromuscular disease.

2 EINLEITUNG

2.1 Spinale Muskelatrophie (SMA) – Untergang der Motoneurone

Neuromuskuläre Erkrankungen sind charakterisiert durch die Schädigung der Muskulatur und führen unter anderem zu Muskelschmerzen, -krämpfen und -schwächen [1]. Ursache kann entweder eine direkte Beeinträchtigung der jeweiligen Muskulatur sein oder eine indirekte Störung der entsprechenden Neuronen [2]. Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine indirekte neuromuskuläre Erkrankung, die durch die Degeneration der α -Motoneurone im Rückenmark gekennzeichnet ist [3, 4]. Eines von 6.000–10.000 Neugeborenen erkrankt an dieser autosomal-rezessiven genetischen Erkrankung, welche somit die Hauptursache für den Säuglingstod ist [4]. Symptome der SMA sind Muskelschwäche, z. B. im Bereich des respiratorischen Apparats, reduzierter Muskeltonus und dadurch Unbeweglichkeit [5]. SMA ist eine der am besten erforschten neurodegenerativen Erkrankungen [6]. Sie kann in fünf verschiedene Formen unterteilt werden [4-6]: Typ 0 als pränatale Form ist embryonal letal. Typ I-Patienten lernen weder sitzen noch stehen, da sich die Muskelschwäche innerhalb weniger Monate nach der Geburt entwickelt. Sie sterben in den ersten beiden Lebensjahren. Patienten, die an Typ II erkrankt sind, zeigen um das 2. Lebensjahr herum erste Symptome der Muskelschwäche. Sie sind früh an den Rollstuhl gebunden und sterben, ehe sie das 20. Lebensjahr erreichen. Typ III entwickelt sich erst nach dem 2. Lebensjahr, die Patienten können sitzen, stehen, mit Einschränkungen laufen und haben eine mittlere Lebenserwartung. Die mildeste Form ist der Typ IV, welcher sehr selten ist, erst im Erwachsenenalter mit ca. Mitte 30 auftritt und mit einer normalen Lebenserwartung einhergeht.

Ursache der Erkrankung ist eine Mutation oder Deletion im *survival motor neuron (SMN)*-Gen [6]. Der Mensch besitzt zwei homologe Kopien des *SMN*-Gens, *SMN1* und *SMN2*, welche durch alternatives Spleißen entstehen [6]. Im gesunden Menschen wird durch einen Cytidin-zu-Thymidin-Austausch im *SMN2*-Gen nicht die Aminosäuresequenz des Proteins verändert, sondern die Aktivität eines Spleißmodulators gestört [6]. Dies führt dazu, dass die Mehrheit an *SMN2* kein Exon 7 enthält, welches die C-terminale Domäne von SMN kodiert [6]. Dadurch kann das Protein nicht oligomerisieren und wird schneller über das Proteasom abgebaut [7]. Dieses Defizit kann im gesunden Menschen durch die *SMN1*-Expression kompensiert werden [6]. In SMA-Patienten hingegen ist das aus dem *SMN1*-Gen resultierende SMN-Protein durch Deletion oder Mutation inaktiv (Abbildung 1) [6]. Dementsprechend kann der geringe Anteil an wildtypischem SMN-Protein in SMA-Patienten den Verlust von *SMN1* nicht ausgleichen [6]. Der Schweregrad korreliert invers mit der Anzahl an *SMN2*-Kopien, d. h. je weniger *SMN2* vorhanden ist, desto schwerer ausgeprägt ist die Erkrankung [4, 8].

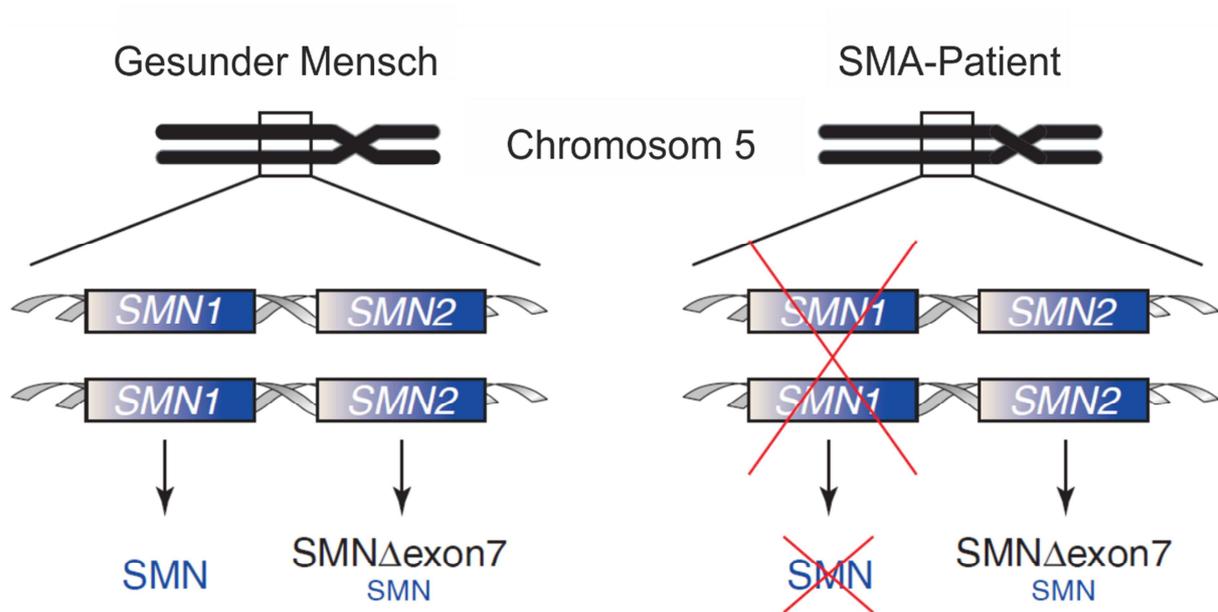


Abbildung 1: Genetische Ursache der spinalen Muskelatrophie. Zwei nahezu identische Kopien des SMN-Gens sind auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q13) lokalisiert: SMN1 und SMN2. Funktionales SMN-Protein wird in gesunden Individuen hauptsächlich durch SMN1 produziert, während dem SMN2-Produkt überwiegend das Exon 7 fehlt und dieses dadurch nicht funktional ist. In SMA-Patienten ist das aus dem SMN1-Gen resultierende Protein durch Deletion oder Mutation inaktiv. Republiziert mit der Genehmigung von Elsevier Ltd., von [6]; Genehmigung erteilt durch das Copyright Clearance Center, Inc..

Das Protein SMN ist ubiquitär exprimiert und sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert [6]. Aus welchem Grund eine SMN-Reduktion ausschließlich einen Effekt auf neuronale Zellen zeigt, ist bisher nicht geklärt. SMN spielt unter anderem eine Rolle im axonalen mRNA-Transport von β -Aktin. [6]. Dementsprechend könnte ein ineffizienter mRNA-Transport zu einer Degeneration der Motoneurone führen. Die genetische Ablation von β -Aktin in Maus-Motoneuronen hat jedoch keinen phänotypischen Effekt auf das neuromuskuläre System [9]. Die wichtigste Rolle von SMN besteht in der Regulation der Zusammensetzung des Spleißosoms und somit des prä-mRNA-Spleißens [10]. Eine direkte Korrelation zwischen Defekten in der Biogenese der *uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles* (U-snRNPs), die Bestandteile des Spleißosoms, und SMA konnte von Gabanella und Kollegen gezeigt werden, indem sie nachwiesen, dass die Aktivität der U-snRNP-Biogenese im Rückenmark von SMA-Mäusen deutlich reduziert ist [11]. Eine Deletion des N-Terminus von SMN führt darüber hinaus zu einer Umorganisation der U-snRNPs und folglich zu einer Inhibition des Spleißens [10]. Arbeiten von See und Sleight aus dem Jahr 2014 zeigten, dass die mRNAs der Proteine Neurexin2 und Chondrolectin im SMA-Maus- bzw. Zebrafisch-Modell fehlerhaft gespleißt werden [12, 13]. Beide Proteine sind wichtig für das Motoneuronenwachstum. Möglicherweise ist in der SMA vor allem das Spleißen Motoneuron-spezifischer Proteine beeinträchtigt. Eventuell spielen ferner Neuron-spezifische Spleißregulatoren eine Rolle, wie z. B. Nova1, welches in Motoneuronen hoch exprimiert wird [14].

Bäumer und Kollegen zeigten, dass erst die späte Phase der Erkrankung durch fehlerhaftes Spleißen charakterisiert ist [15]. Die Beeinträchtigung des Spleißens spielt somit zwar eine wesentliche Rolle in der spinalen Muskelatrophie, spiegelt aber möglicherweise nicht die zentrale Ursache der Erkrankung wider [16]. Offenbar sind eher andere Funktionen von SMN für die Vulnerabilität der Motoneurone in der frühen Phase von SMA verantwortlich, welche bisher noch unbekannt sind. Aktuelle Therapieansätze zielen jedoch auf die Synthese der Bestandteile des Spleißosoms und deren Haupt-Regulatoren ab. Sie betreffen überwiegend Faktoren, welche die *SMN*-Expression positiv beeinflussen, z. B. die Insertion von Exon 7 in die *SMN2*-mRNA oder die exogene Expression des SMN-Proteins [17]. Im Dezember 2016 wurde das erste und bisher einzige Medikament zur Behandlung von SMA zugelassen [18, 19]: Nusinersen ist ein Antisense-Oligonukleotid, welches intrathekal (in den Liquorraum) ins zentrale Nervensystem injiziert wird. Es blockiert einen bestimmten Spleißmodulator und verändert so das alternative Spleißen des *SMN2*-Gens, so dass Exon 7 inkludiert bleibt. Dadurch entsteht ein zu *SMN1* identisches Protein. Nusinersen sorgt demnach für eine Erhöhung der Gesamtmenge an SMN-Protein und verhindert so das Fortschreiten der Erkrankung, es führt allerdings zu keiner Heilung.

2.2 Spleißen – Reifung der messenger-RNA

Als Spleißen bezeichnet man die im Anschluss an die Transkription ebenfalls im Zellkern stattfindende Prozessierung der Vorläufer- bzw. prä-mRNA zur reifen mRNA [20]. Dabei werden die *intervening sequences* (Introns) aus der prä-mRNA entfernt und die angrenzenden *expressed sequences* (Exons) miteinander zur reifen mRNA verbunden [20]. Richard J. Roberts und Phillip A. Sharp erhielten 1993 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin für die Entdeckung des Spleißmechanismus. Erste Erkenntnisse diesbezüglich gab es allerdings schon im Jahr 1977 [21, 22]. Katalysiert wird der Vorgang des Spleißens durch das Spleißosom, einem großen Protein-RNA-Komplex, bei dem die RNA die katalytische Funktion übernimmt [20]. Es gibt zwei verschiedene Spleißosom-Typen [23]: das Haupt-Spleißosom, bestehend aus fünf verschiedenen *uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles* (U-snRNP), welche nach dem jeweiligen snRNA-Bestandteil (U1, U2, U4/6 und U5) benannt sind, und das Neben-Spleißosom, ebenfalls bestehend aus fünf verschiedenen snRNPs (U11, U12, U4atac/U6atac und U5), wobei das U5 snRNP identisch ist mit dem des Haupt-Spleißosoms. Die U-snRNAs sind assoziiert mit weiteren Uridin-spezifischen Proteinen und sieben Protein-Co-Faktoren: die Sm-Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F, G (bzw. LSm-Proteine 2-8) [24]. Zusammen bilden sie so das reife U-snRNP (siehe 2.2.1.1). Mehr als 99 % der Spleißreaktionen in Eukaryoten werden durch das Haupt-Spleißosom katalysiert, weshalb diese Reaktionen auch als

kanonisches Spleißen bezeichnet werden [25]. Das Neben-Spleißosom ist für weniger als 0,5 % der Spleißreaktionen verantwortlich. Die Bedeutung und Funktion dieses Mechanismus ist bisher wenig verstanden [26].

Der kanonische Spleißmechanismus wird in zwei Spleißreaktionen unterteilt [20]: Zunächst erkennt das U1-snRNP die 5'-Spleißstelle durch Basenpaarung der U1-snRNA mit der prä-mRNA und bildet den so genannten Komplex E bzw. Exon-Definitions-komplex (Abbildung 2 a). Dieser Prozess wird durch den C-Terminus der RNA-Polymerase II gefördert, welcher direkt mit dem U1-snRNP interagiert. Die 3'-Spleißstelle der prä-mRNA hingegen wird vom U2-snRNP und anderen assoziierten Faktoren erkannt. Nachfolgend erkennt die U2-snRNA den so genannten *branchpoint*, eine konservierte Sequenz 15–50 Nukleotide vor der 3'-Spleißstelle, und interagiert mit dem U1-snRNP, um das Prä-Spleißosom (Komplex A bzw. Intron-Definitions-komplex) zu formieren (Abbildung 2 a). Dieser Vorgang ist ATP-abhängig und bringt die 5'-Spleißstelle, den *branchpoint* und die 3'-Spleißstelle in unmittelbare Umgebung zueinander. U4-U6- und U5-snRNPs werden anschließend als Trimer rekrutiert, um zusammen mit U1- und U2-snRNPs den Komplex B bzw. das prä-katalytische Spleißosom zu bilden (Abbildung 2 a). Nach erfolgter Neuordnung und Freisetzung von U1- und U4-snRNP entsteht der katalytisch aktive Komplex B* (Abbildung 2 a). Dieser katalysiert die erste Spleißreaktion, bei der das Sauerstoffatom der 2'-OH-Gruppe eines Adenosins aus dem *branchpoint* ein Phosphoratom einer Phosphodiesterbindung in der 5'-Spleißstelle angreift, wodurch das 5'-Exon freigesetzt wird (1. Umesterung, Abbildung 2 b). Dabei entsteht der so genannte Komplex C (katalytisches Spleißosom), welcher das freie Exon 1 und das Intron-Exon 2-Lariat-Intermediat beinhaltet (Abbildung 2 a). Daraufhin erfolgen weitere ATP-abhängige Neuordnungen, gefolgt von der zweiten Spleißreaktion, bei der das Sauerstoffatom der 3'-OH-Gruppe des 5'-Exons die 3'-Spleißstelle angreift (2. Umesterung, Abbildung 2 b). Dies resultiert im post-spleißosomalen Komplex bestehend aus U2-U5-U6-snRNPs, dem Lariat-Intron und den gespleißten Exons (Abbildung 2 a). Anschließend werden die ligierten Exons ATP-abhängig durch verschiedene RNA-Helikasen freigesetzt und die U2-U5-U6-snRNPs für eine weitere Spleißreaktion recycelt (Abbildung 2 a) [20]. *In vitro*-Studien zeigten, dass alle Spleißreaktionen reversibel und somit Korrekturvorgänge möglich sind [27-29]. *In vivo* konnte dies bisher allerdings nicht bestätigt werden.

Neben der Basenpaarung innerhalb der U-snRNAs und zwischen U-snRNA und prä-mRNA sind zweiwertige Kationen wichtig für die Spleißreaktion [30]. Sie stabilisieren die aktiven RNA-Konformationen [30]. Die beiden katalytischen Spleißreaktionen benötigen nur wenig ATP, ein Großteil der Energie wird hingegen für die Neuordnungen der U-snRNAs verbraucht [20].

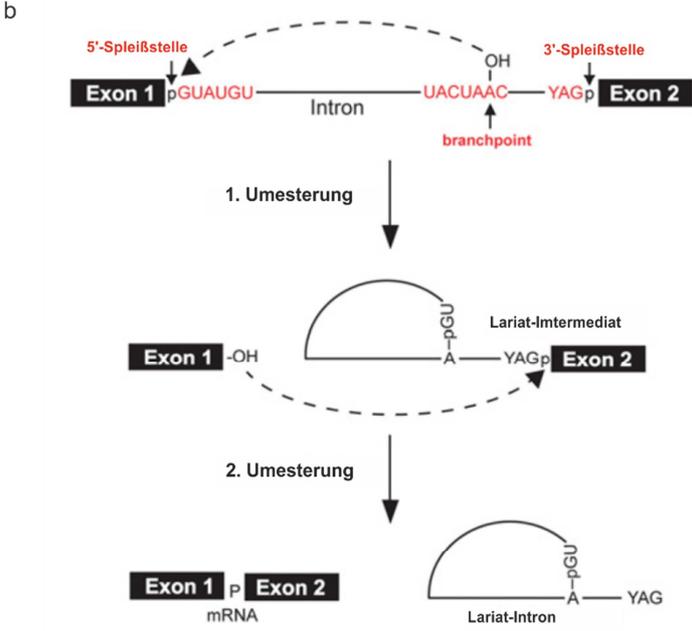
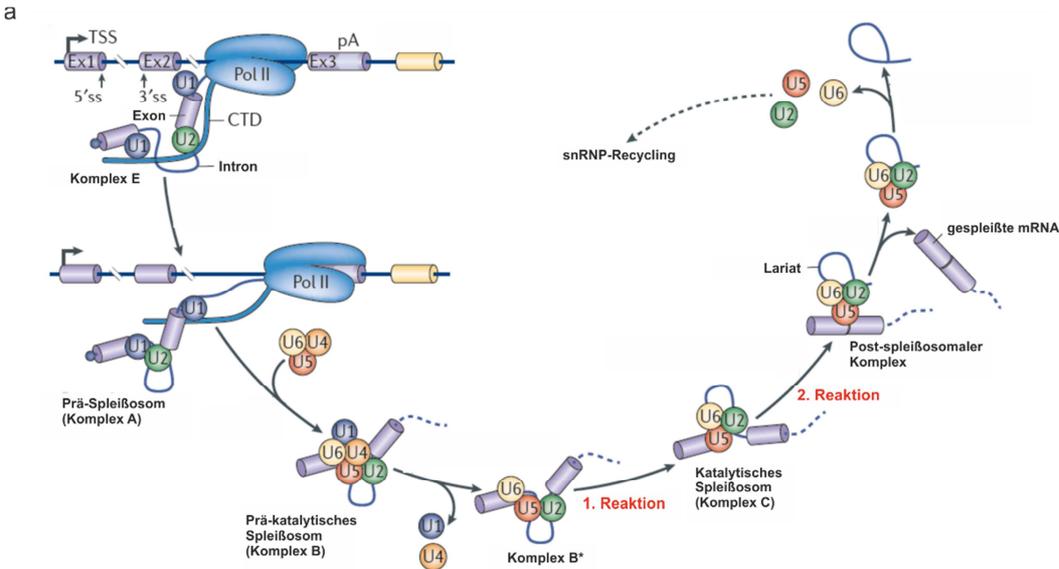


Abbildung 2: Der Mechanismus des prä-mRNA-Spleißens wird in zwei Spleißreaktionen unterteilt. **a**, Schematische Darstellung des Spleißmechanismus. U1 und U2 snRNP erkennen und binden die prä-mRNA über die 5'- und 3'-Spleißstelle unterstützt durch die C-terminale Domäne (CTD) der Pol II während der Transkription (Komplex E). U1- und U2-snRNP interagieren miteinander und bilden das Prä-Spleißosom (Komplex A), welches durch Bindung von U4-U6.U5 zum Prä-katalytischen Spleißosom (Komplex B) übergeht. Durch mehrere Neuarrangierungen und Freisetzung von U1 und U4 entsteht der katalytisch aktive Komplex B*, welcher die 1. Spleißreaktion katalysiert, so dass das katalytische Spleißosom (Komplex C) entsteht. Dieser beinhaltet das freie Exon 1 und das Intron-Exon 2-Lariat-Intermediat. Nach weiteren Neuarrangierungen erfolgt die 2. Spleißreaktion, welche im post-spleißosomalen Komplex, bestehend aus U2-U5-U6 snRNPs, Lariat-Intron und gespleißten Exons, resultiert. Nach Freisetzung der gespleißten Exons werden U2, U5 und U6 für eine weitere Spleißreaktion recycelt. TSS: Transkriptionsstartstelle, pA: Poly-A-Signal. Neu aufgelegt mit der Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd, von [20], Genehmigung erteilt durch das Copyright Clearance Center, Inc.. **b**, Chemische Darstellung der 2-Stufen-Umesterung des prä-mRNA-Spleißens. In der 1. Umesterung greift das Sauerstoffatom der 2'-OH-Gruppe eines Adenosins aus dem branchpoint ein Phosphoratom einer Phosphodiesterbindung in der 5'-Spleißstelle an, wodurch das 5'-Exon freigesetzt wird. In der 2. Umesterung greift das Sauerstoffatom der 3'-OH-Gruppe des 5'-Exons die 3'-Spleißstelle an, wodurch das Exondimer und das Lariat-Intron freigesetzt werden. Y = Pyrimidin, C = Cytidin, U = Uridin, A = Adenosin, G = Guanosen. Modifiziert nach Chen und Cheng, 2012 [31].

Das Spleißosom ist verantwortlich für sowohl das konstitutive als auch das alternative Spleißen [20]. Letzteres ermöglicht die Prozessierung verschiedener Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen aus der gleichen prä-mRNA [32]. Etwa 90 % des humanen Genoms werden alternativ gespleißt [33]. Kontrolliert wird dieser Vorgang durch *trans*-wirkende Spleißfaktoren (z. B. Spleißaktivatoren bzw. -repressoren) und verschiedene *cis*-wirkende regulatorische Spleißelemente (SREs) [20]: *exonic splicing enhancers* (ESEs), *intronic splicing enhancers* (ISEs), *exonic splicing silencers* (ESSs) und *intronic splicing silencers* (ISSs). Darüber hinaus spielen die Chromatinstruktur und Nukleosomenposition eine wichtige Rolle [20]. Der häufigste Mechanismus in Vertebraten ist das so genannte *Exon Skipping*, bei dem ein oder mehrere Exons aus der prä-mRNA entfernt werden [32]. Neben dem kanonischen und nicht-kanonischen Spleißen durch Haupt- bzw. Neben-Spleißosom wurde ein Protein-unabhängiges Spleißsystem entdeckt [34, 35]. Die zweistufige Spleißreaktion wird durch ein Ribozym katalysiert, welches nur aus einem U6-U2-snRNA-Komplex besteht. Dieser Mechanismus wird als Selbstspleißen bezeichnet [34, 35].

2.2.1 Das Spleißosom – eine RNA-basierte katalytische Maschinerie

Der Zusammenbau des Spleißosoms, bestehend aus den verschiedenen U-snRNPs, erfolgt in mehreren Schritten und in verschiedenen Zellkompartimenten [20]. Die U-snRNAs werden zunächst im Zellkern von der RNA-Polymerase II (für U1-, U2-, U4-, U5-, U11-, U12- und U4atac-snRNAs) bzw. III (für U6- und U6atac-snRNAs) transkribiert [36], wobei spezifische Phosphorylierungen der C-terminalen Domäne der Enzyme und der U-snRNA-spezifische Promotor besonders wichtig für die korrekte Prozessierung sind [37, 38]. Zusätzlich zu den generellen Transkriptionsfaktoren wird für die Initiation der U-snRNA-Transkription die Bindung des snRNA-aktivierenden Proteinkomplexes (SNAPc) benötigt [39, 40]. Die Reifung des 3'-Endes der Polymerase II-transkribierten U-snRNA ist zum einen abhängig von dem so genannten Integrator-Komplex, welcher das Transkript an der Terminator-Sequenz endonukleolytisch spaltet, und zum anderen von der Addition einer 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende der U-snRNA [36]. Die Polymerase III-transkribierte U6-snRNA hingegen erhält eine 5'-Y-Methylphosphat-Kappe und die Bildung des reifen U-snRNP erfolgt ausschließlich im Zellkern [41, 42].

Die Polymerase II-transkribierten U-snRNAs werden aus dem Kern in das Cytoplasma exportiert, wo sie weiter reifen, ehe sie zurück in den Kern transportiert werden [20]. Dieser Export wird reguliert durch zahlreiche snRNA-spezifische Exportproteine (z. B. PHAX) [43]. Intranukleär lokalisiert die prä-snRNA sowohl vor dem Export als auch nach dem Re-Import in so genannten Cajalkörperchen [44, 45]. Innerhalb dieser nukleären Struktur sind Exportproteine angereichert [46, 47]. Cajalkörperchen

scheinen folglich an der Regulation des U-snRNA-Exports aus dem Kern beteiligt zu sein. Im Cytoplasma dissoziiert der Export-Komplex von der U-snRNA durch Dephosphorylierung des Proteins PHAX [48]. Die cytoplasmatische Reifung der U-snRNPs wird entscheidend reguliert durch den *survival motor neuron* (SMN)- und PRMT5-Komplex [49] (siehe 2.2.1.1). Der SMN-Komplex rekrutiert die exportierte U-snRNA und katalysiert die Assoziation des Sm-Kerns, bestehend aus sieben Sm-Proteinen (B/B', D1, D2, D3, E, F, G), an die U-snRNA, wodurch die Sm-Kerndomäne gebildet wird [50]. Der Sm-Kern dient zum einen der Stabilisierung der U-snRNA und dem Schutz vor Abbau und wird zum anderen für den Re-Import in den Kern benötigt [20].

Zur Vorbereitung des Re-Imports rekrutiert der SMN-Komplex die Trimethylguanosin-Synthase 1 (TGS1), eine RNA-Methyltransferase, die am 5'-Ende der U-snRNA eine 2,2,7-Trimethylguanosinstruktur (TMG) katalysiert [51]. Diese hypermethylierte TMG-Kappe fungiert als Kern-Lokalisationssignal [52], ebenso wie der Sm-Kern selbst [53]. Darüber hinaus wird das 3'-Ende der U-snRNA exonukleolytisch auf seine finale Länge verkürzt [20]. Die TMG-Kappe fördert die Bildung des Import-Komplexes, bestehend aus dem Import-Adapterprotein Snurportin (SPN) und dem Import-Rezeptor Importin- β [20]. Zurück im Kern lokalisiert das U-snRNP erneut in Cajalkörperchen, um dort weiter zu reifen (z. B. durch Bindung U-snRNP-spezifischer Proteine) [54, 55]. Anschließend erfolgt die Speicherung der reifen U-snRNPs in so genannten nukleären *speckles* [56]. SMN bzw. der SMN-Komplex lokalisiert nach dem Re-Import in Gems, den *Gemini of cajal bodies*, welche eine Zwillingsstruktur der Cajalkörperchen sind [57, 58]. Darüber hinaus scheinen die Cajalkörperchen eine wichtige Rolle im Recycling der U-snRNPs zu spielen [55, 59].

2.2.1.1 Die humane U-snRNP-Biogenese im Cytoplasma

In vitro erfolgt die Biogenese der U-snRNPs spontan, d. h. die Zugabe einer U-snRNA zu den sieben Sm-Proteinen reicht aus, um ein U-snRNP zu bilden [60, 61]. *In vivo* hingegen ist sie abhängig von ATP, der Temperatur und dem SMN-Komplex [49, 62].

Nach dem Export der prä-U-snRNA aus dem Kern erfolgt die Reifung des U-snRNP-Partikels im Cytoplasma [20]. Der in Kapitel 2.2.1 bereits erwähnte PRMT5-Komplex spielt hierbei eine wichtige Rolle [63]. Dieser auch als Methylosom bezeichnete Komplex besteht aus der Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5), dem Methylosom-Protein 50 (MEP50/WD45/WDR77) und dem *chloride conductance regulatory protein* *ICln* (pICln) [64]. Das ubiquitär exprimierte Protein pICln, welches ursprünglich als eine Untereinheit eines Chloridionenkanals identifiziert wurde [65], liegt überwiegend cytoplasmatisch vor [66]. Es besitzt drei saure Domänen und eine Pleckstrin-homologe (PH)-Domäne [67]. Letztere besteht aus ca. 120 Aminosäuren und ist charakterisiert durch die Fähigkeit Phosphatidylinositol innerhalb der Membran oder von Proteinen zu binden [68]. Inzwischen

ist bekannt, dass pICln durch Rekrutierung der Sm-Proteine B, D1 und D3 zu PRMT5 zentral an der frühen Phase der U-snRNP-Biogenese beteiligt ist (Abbildung 3) [49, 64, 69]. Anschließend dimethyliert PRMT5 diese drei Sm-Proteine symmetrisch [63, 69]. pICln wirkt als *assembly chaperone* und bildet zwei Subkomplexe: zum einen mit SmB/B' (SmB' entsteht als Isoform von SmB durch alternatives Spleißen) und SmD3 (B/D3), und zum anderen mit den Sm-Proteinen D1, D2, F, E und G in Form einer Ringstruktur [70, 71]. In dieser auch als 6S-Ring bezeichneten sehr stabilen hexameren Struktur bindet pICln direkt an SmD1 und SmG [70, 72]. Die Bindung der Sm-Proteine an die U-snRNA wird durch die Interaktion mit pICln inhibiert [49, 73] und wird deshalb auch als *kinetic trap* bezeichnet [70]. Anschließend bindet der SMN-Komplex, bestehend aus GEMIN2-8, UNRIP und SMN, die Sm-Proteine und katalysiert in der späten Phase der U-snRNP-Biogenese deren Bindung an die U-snRNA, wobei pICln dissoziiert (Abbildung 3) [62, 74]. Das Protein UNRIP ist für die intrazelluläre Verteilung des SMN-Komplexes verantwortlich [75]. SMN bindet über seine Tudor-Domäne an die symmetrisch dimethylierten Sm-Proteine [76]. GEMIN6 und 7 enthalten eine Sm-Bindestelle und interagieren ebenfalls direkt mit den Sm-Proteinen [77]. Die Erkennung der Sm-Stelle auf der U-snRNA erfolgt über das WD40-Domänen-Protein GEMIN5 [78]. GEMIN2 hingegen bindet direkt an den 6S-Komplex und umschließt die Sm-Proteine D1/D2/F/E/G in einer hufeisenähnlichen Form, wodurch der 8S-Komplex (pICln/D1/D2/F/E/G/GEMIN2/SMN) gebildet wird [20]. Dadurch sorgt GEMIN2 für die geeignete Orientierung, um den Ringschluss und die U-snRNA-Bindung zu ermöglichen [79]. Wie die Sm-Proteine B und D3 hinzukommen, um den vollständigen Ring bestehend aus D3-B-D1-D2-F-E-G zu bilden, ist bislang nicht bekannt. Ebenfalls unklar ist der Mechanismus zur Auflösung der stabilen Zwischenprodukte (6S-Struktur und pICln-SmB/D3-Trimer). Für die Spezifität der Biogenese-Reaktion ist der SMN-Komplex entscheidend, da er die Bildung der Sm-Kerndomäne mit nicht sn-spezifischer RNA verhindert [74, 80].

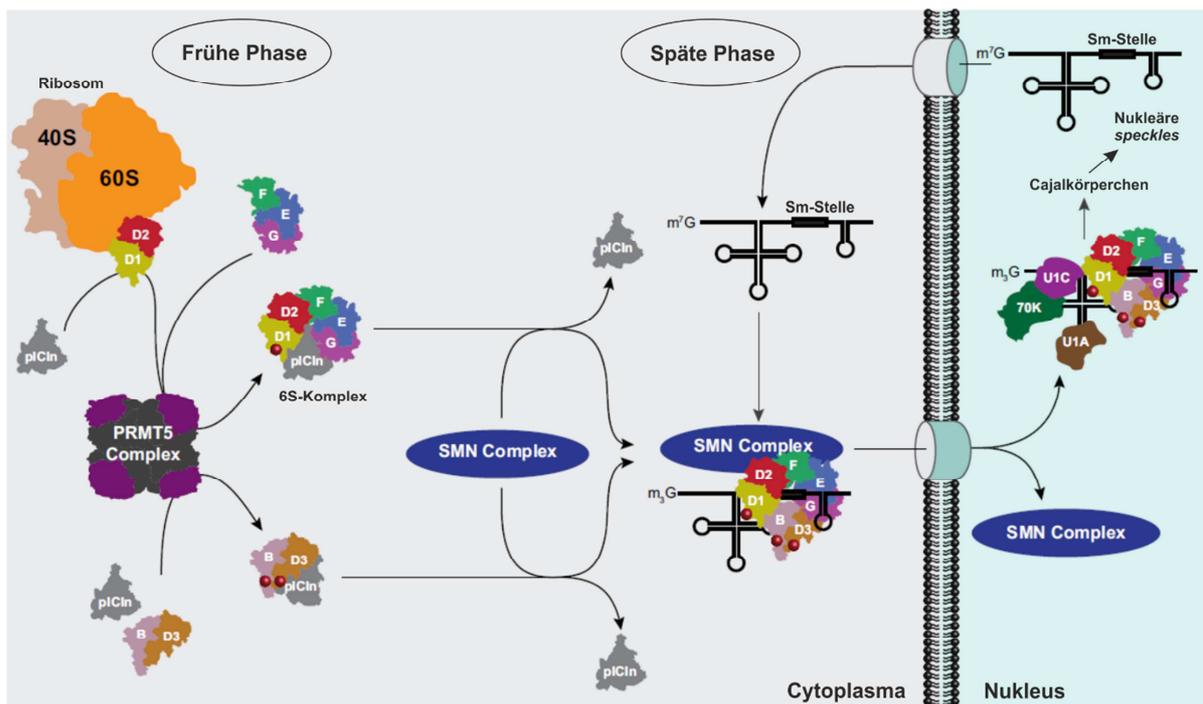


Abbildung 3: Cytoplasmatischer Teil der U-snRNP-Biogenese. Während der frühen Phase rekrutiert pICln im Cytoplasma die neu synthetisierten Sm-Proteine D1/D2 und B/D3 zum PRMT5-Komplex, wo die Sm-Proteine B, D1 und D3 symmetrisch dimethyliert werden (rot markiert). pICln bildet zwei Subkomplexe: zum einen mit SmB/D3 und zum anderen eine stabile Ringstruktur mit SmD1/D2/F/E/G (6S-Komplex). Während der späten Phase katalysiert der SMN-Komplex die Assoziation der Sm-Proteine auf die Sm-Stelle der U-snRNA unter Freisetzung von pICln. Anschließend dissoziiert das U-snRNP in den Nucleus, wo es in Cajalkörperchen weiter reift und in nukleären speckles gespeichert wird. Republiziert mit der Genehmigung vom Springer-Verlag Berlin/Heidelberg, von [36]; Genehmigung erteilt durch das Copyright Clearance Center, Inc..

2.3 Posttranslationale Modifikationen – ein Überblick

Die U-snRNP-Biogenese ist stark reguliert durch posttranslationale Modifikationen (PTM) [81-85]. Sowohl SMN als auch pICln werden *in vivo* phosphoryliert [81]. PTM können die Aktivität, Lokalisation oder Funktion eines Proteins oder die Interaktion mit anderen Proteinen regulieren [86, 87]. Zu den bekanntesten PTM-Formen zählen unter anderem die ATP-abhängige Phosphorylierung, S-Adenosylmethionin-abhängige Methylierung, Acetyl-CoA-abhängige Acetylierung und Kohlenhydrat-abhängige Glycosylierung sowie die Ubiquitinierung, welche Proteine für den proteasomalen bzw. lysosomalen Abbau markiert [86]. PTM sind signalabhängig und können einzeln oder in Kombination auftreten. Sie sind meistens transient und reversibel [87]. Katalysiert werden die Modifikationen durch spezielle Enzyme. Etwa 5 % des Genoms höherer Eukaryoten kodiert für eben diese Enzyme [86].

2.3.1 PTM regulieren Protein-Protein-Interaktionen in der U-snRNP-Biogenese

Proteine agieren selten allein [88]. Sie gehen überwiegend Interaktionen miteinander ein um biologisch aktiv zu sein [88]. In der U-snRNP-Biogenese spielen Protein-Protein-Interaktionen (PPI) eine wichtige Rolle [89]. Der PRMT5-Komplex, welcher die Methylierung der Sm-Proteine katalysiert, ist ein Multiprotein-Komplex bestehend aus mehreren Protein-Untereinheiten, die miteinander interagieren [63]. PPI können zum einen stabil und zum anderen transient sein [88]. Die Interaktion zwischen PRMT5 und dem Adapterprotein pICln beispielsweise ist eine transiente, reversible Interaktion [90].

PPI und PTM stehen häufig in gegenseitigem funktionellen Einfluss [91]. Viele PTM modulieren die Bindungsaffinität zwischen Proteinen durch elektrostatische oder strukturelle Veränderungen der involvierten Interaktionsbereiche und steuern so die jeweiligen Aktivitäten der Proteine [91]. Im Rahmen der U-snRNP-Biogenese interagiert der SMN-Komplex, bestehend aus neun Protein-Untereinheiten, temporär mit den Sm-Proteinen, um diese auf die U-snRNA zu übertragen [76, 77]. Diese Interaktion wird durch PTM, wie beispielsweise durch Phosphorylierung von SMN, reguliert [81]. Mehr als 60 % der PTM erfolgen an den funktionalen Proteindomänen, die in direkte Protein-Protein-Interaktionen involviert sind [92]. PTM spielen demnach eine zentrale Rolle in der Modulation von PPI. Eine der häufigsten PTM im Menschen ist die Phosphorylierung [91], welche auch in der U-snRNP-Biogenese eine zentrale Rolle einnimmt [81].

2.3.2 Proteinphosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen ist die am weitesten verbreitete posttranslationale Modifikation [91]. Sowohl in der Hefe als auch in *A. thaliana* sind phosphorylierte Proteine häufiger in Protein-Protein-Interaktionen vorhanden als Proteine ohne Phosphorylierungsstellen [91]. In Eukaryoten wird bei der Phosphorylierung eine Phosphatgruppe überwiegend auf einen Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Rest übertragen (Abbildung 4) [86]. Phosphorylierungen verändern die Struktur eines Proteins und können dadurch beispielsweise aktivierend, deaktivierend oder funktionsmodifizierend wirken und somit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen [93, 94]. Darüber hinaus regulieren sie zahlreiche weitere Prozesse, wie die Zellproliferation oder Apoptose [95].

Katalysiert wird die Phosphorylierung durch Protein-Kinasen [93]. Zum ersten Mal beschrieben wurde eine Protein-Kinase-Aktivität 1954 durch Burnett und Kennedy in der Leber [96]. Protein-Kinasen katalysieren den Transfer einer Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxygruppe einer spezifischen Aminosäure [97]. Diese Phosphorylierungsreaktion kann in drei Stufen eingeteilt werden: (1) Substrat und ATP binden an das aktive Zentrum der Kinase, (2) Transfer

der Phosphatgruppe von ATP auf das Substrat und (3) ADP und das phosphorylierte Substrat verlassen das aktive Zentrum der Kinase [97]. Des Weiteren ist für die Reaktion das zweiwertige Kation Mg^{2+} wichtig, da es die ATP-Bindeaffinität zur Kinase erhöht [98].

Protein-Kinasen werden in vier Hauptgruppen eingeteilt: (1) Serin/Threonin-Kinasen, (2) Tyrosin-Kinasen, (3) Histidin-Kinasen und (4) Aspartat/Glutamat-Kinasen [99]. Zudem gibt es dual-spezifische Kinasen, welche sowohl Serine und Threonine als auch Tyrosine phosphorylieren [100, 101]. Phosphorylierungen sind reversibel, sie können durch Aminosäure-spezifische Phosphatasen entfernt werden [95]. Das Phosphoproteom der Säugetiere weist überwiegend Phosphoserine auf (90 %) [86]. Das humane Kinom umfasst über 500 verschiedene Kinasen [86]. Sie repräsentieren die größte Klasse der PTM-Enzyme. [86]. Der Anteil phosphorylierter Proteine *in vivo* dagegen ist sehr klein, da der Umsatz einer Phosphorylierung sehr hoch ist [87].

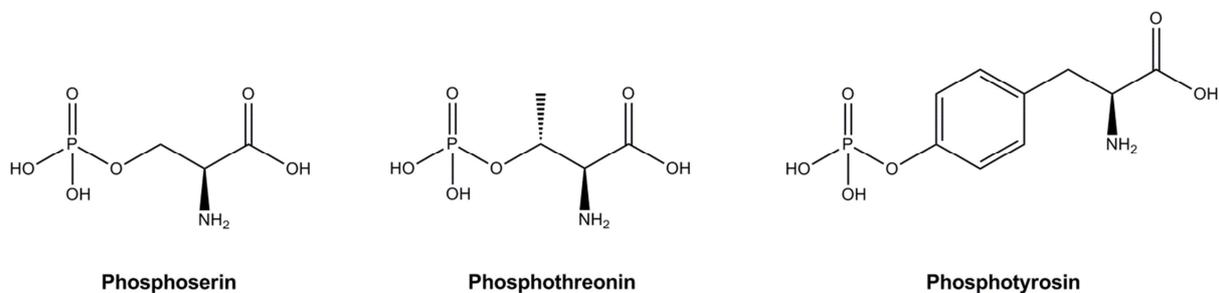


Abbildung 4: Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung

2.3.2.1 Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen

Die katalytische Domäne von Serin/Threonin-Kinasen ist hoch konserviert [99]. Die Substratspezifität einer Serin/Threonin-Kinase wird bestimmt durch die Nachbarsequenz des jeweiligen zu phosphorylierenden Serins bzw. Threonins im Substratprotein [99]. Jede Unterfamilie der Serin/Threonin-Kinasen besitzt ihre eigene Konsensus-Sequenz für die Phosphorylierung [99]. Protein-Kinasen können sowohl in einer aktiven als auch inaktiven Form vorliegen [102]. Der Wechsel zwischen beiden Formen ist unter anderem abhängig von Aktivator/Inhibitor-Proteinen, Co-Faktoren, der subzellulären Lokalisation oder auch von Phosphorylierungen [99]. Ein Inhibitor beispielsweise kann eine Kinase in der inaktiven Form fixieren, indem er das aktive Zentrum entweder direkt (kompetitiv) oder indirekt (allosterisch) strukturell blockiert und so die Substratbindung verhindert [103]. Eine Hemmung durch strukturelle Elemente, die Teil der Kinase selbst sind, wird als Autoinhibition bezeichnet [99]. Viele Kinasen benötigen zur Aktivierung die Phosphorylierung eigener Serine oder Threonine [99]. Diese liegen meistens im so genannten Aktivierungssegment im aktiven

Zentrum und werden entweder von der Kinase selbst (Autophosphorylierung) oder von einer anderen Kinase phosphoryliert [99].

2.3.2.1.1 Die Serin/Threonin-Kinase *Unc-51-like kinase 1*

Die Serin/Threonin-Kinase *Unc-51-like kinase 1* (ULK1/ATG1), die zur ULK/Atg1-Familie gehört, ist von der Hefe bis zum Säuger konserviert [104]. Als erstes identifiziert wurde das ULK1-Ortholog *apg1* im Jahr 1993 in *S. cerevisiae* als Regulator der Autophagie [105]. Vier Jahre später erfolgte die Charakterisierung als Serin/Threonin-Kinase, ebenfalls in der Hefe und im Zusammenhang mit Autophagie [106]. Innerhalb der nachfolgenden Jahre wurde bekannt, dass Atg1 direkt oder indirekt mit zahlreichen anderen Proteinen der *autophagy-related protein* (Atg)-Familie interagiert [107].

Zur ULK-Familie gehören neben ULK1 zudem ULK2, ULK3, ULK4 und STK36 [108]. ULK1 und ULK2 zeigen deutliche Homologien, sie sind hinsichtlich der Kinase-Domäne zu 78 % identisch [108]. ULK1 und ULK2 spielen eine wichtige Rolle in der Autophagie-Induktion [109] und zeigen hier eine funktionelle Redundanz [110]. Die Autophagie ist ein evolutionär konserviertes Selbst-Degradationssystem von intrazellulären Komponenten durch einen autophagosomal-lysosomalen Signalweg [111]. Dabei wird die zu degradierende Fracht in Doppelmembranvesikel (Autophagosomen) aufgenommen [111]. Letztere fusionieren anschließend mit einem Lysosom, wodurch die Fracht degradiert wird [111]. Autophagie kann unspezifisch oder aber selektiv erfolgen, z. B. durch die Mitochondrien-spezifische Mitophagie [112]. ULK1 bzw. ULK2 bildet einen >2 MDa großen Komplex mit ATG13, ATG101 und dem *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa* (FIP200/RB1CC1) und induziert Autophagie als Antwort auf Zellstress wie z. B. Nährstoffmangel (Abbildung 5) [113-116]. Der C-Terminus von ULK1/2 bindet dabei an ATG13 und FIP200 [117, 118]. Reguliert wird der ULK1/2-Komplex vom *mammalian target of rapamycin*-Komplex (mTORC1) [113, 119, 120]. Unter normalen Nährstoffbedingungen werden ULK1/2 und ATG13 von mTOR phosphoryliert, nach Stresseinwirkung hingegen erfolgt eine Dephosphorylierung, was zur Aktivierung von ULK1/2 führt [113, 119, 120]. Verstärkt wird diese Aktivierung zusätzlich durch Phosphorylierung von ULK1/2 durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) [121, 122]. ULK1/2 kann darüber hinaus seine Regulatoren AMPK und mTORC1 durch Phosphorylierung negativ regulieren [109, 123-125].

Neben der Autophagie steuert ULK1 durch Phosphorylierung von SEC16A den vesikulären Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Abbildung 5) [126]. In Folge eines hohen Levels an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beschleunigt ULK1 des Weiteren den Zelltod, indem es aus dem Cytoplasma in den Kern transloziert und dort die Aktivierung der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) fördert (Abbildung 5) [127].

ULK1 und ULK2 sind ubiquitär in allen Säugetiergeweben exprimiert [128]. ULK1 und ULK2 regulieren sowohl die neuronale Differenzierung und axonale Elongation als auch den axonalen Transport in unterschiedlichen Organismen wie *C. elegans*, *D. melanogaster* und *M. musculus* [129-132]. In der Maus interagiert ULK1 bzw. Unc51.1 beispielsweise mit SynGAP, einem Regulator der neuronalen Plastizität, und dem Membranprotein Syntenin, welches synaptische Proteine stabilisiert (Abbildung 5) [133, 134]. Loh und Kollegen zeigten im Jahr 2008, dass ULK1 in humanen Neuroblastomzellen das Neuritenwachstum reguliert [135]. ULK1 spielt demnach auch im Menschen eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung.

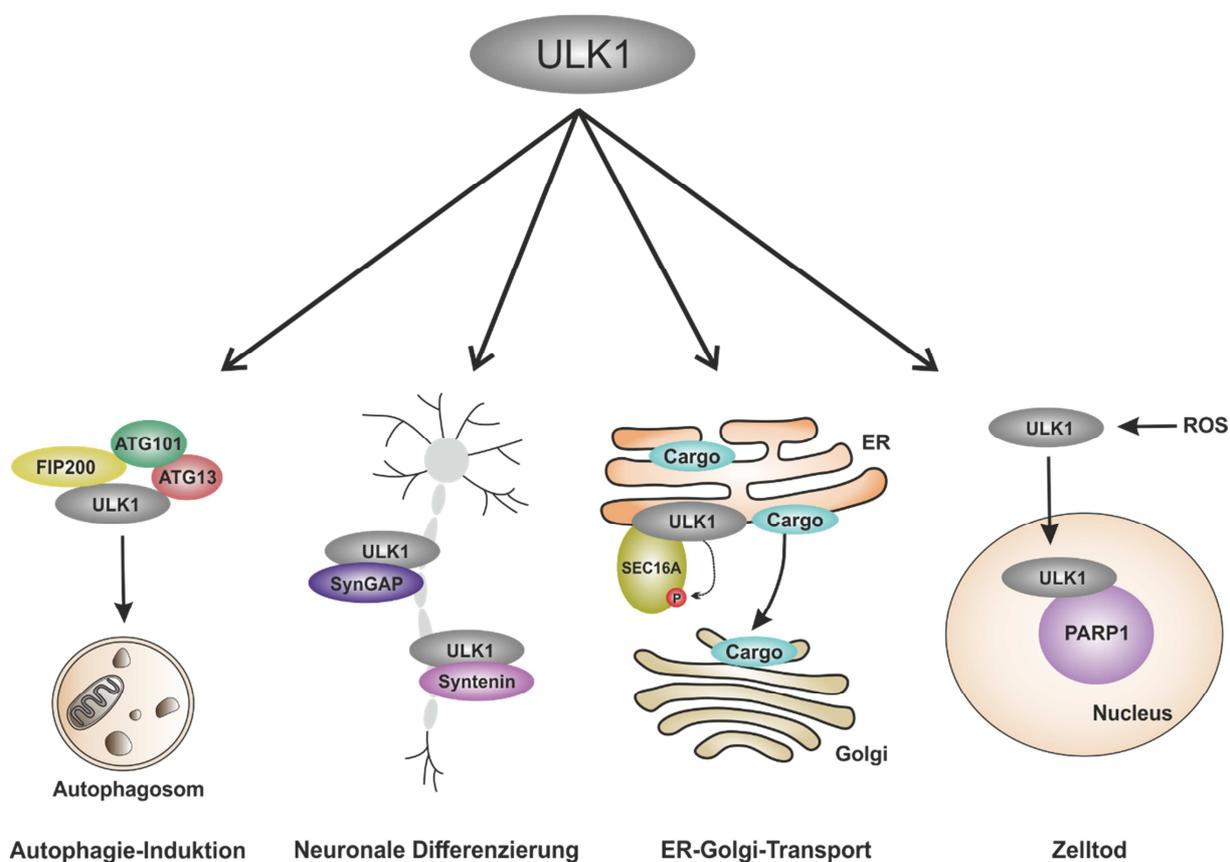


Abbildung 5: Übersicht über die Funktionen von ULK1. ULK1 bildet einen Komplex mit FIP200, ATG101 und ATG13 und induziert Autophagie. Im Rahmen der neuronalen Differenzierung interagiert ULK1 mit SynGAP und Syntenin. Durch Phosphorylierung von SEC16A reguliert ULK1 den Transport von Proteinen (Cargo) vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sorgen für einen Transfer von ULK1 in den Kern, wo es mit PARP1 interagiert und den Zelltod induziert.

Die weiteren Mitglieder der ULK-Familie, ULK3, ULK4 und STK36, zeigen bezüglich der ULK1-Kinasedomäne eine Homologie unterhalb von 42 % (siehe 5.2, Tabelle 1). Sowohl ULK3 als auch die Serin/Threonin-Kinase 36 (STK36) sind durch Regulation der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren GLI1-3 am Sonic-Hedgehog-Signalweg beteiligt, welcher unter anderem für die Neurogenese und embryonale Entwicklung essenziell ist [136-138].

ULK4 ist eine Pseudokinase und somit katalytisch inaktiv [139]. Sie moduliert verschiedene Signalwege, wie z. B. den ERK-Signalweg, und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Neuritenwachstum bzw. -verzweigung und der neuronalen Migration [140].

2.3.3 Protein-Methylierung

Neben der Phosphorylierung ist die Protein-Methylierung eine weitere wichtige Form der PTM [86]. Sie wird definiert durch die Übertragung einer Methylgruppe von einem Methylgruppendorator, wie z. B. S-Adenosylmethionin (SAM), auf eine bestimmte funktionelle Gruppe des Zielmoleküls, wie z. B. Amino-, Hydroxy- oder Thiolgruppen [86]. Häufig handelt es sich hierbei um Reste der Aminosäuren Arginin oder Lysin [86]. Katalysiert wird die Methylierungsreaktion durch Protein-Methyltransferasen (PMT) [86]. Histonmethyltransferasen beispielsweise gehören zu den früh identifizierten PMT [86]. Sie katalysieren den Transfer von einer, zwei oder drei Methylgruppen auf Lysin- und Arginin-Reste von Histonproteinen und spielen damit eine wichtige Rolle in der epigenetischen Genregulation [141, 142]. Protein-Methylierung ist darüber hinaus in der Signaltransduktion, Transkriptionskontrolle und in Protein-Protein-Interaktionen relevant [143, 144]. Unterschieden werden Protein-Methyltransferasen auf Basis der Ziel-Aminosäure nach Protein-Lysin-Methyltransferasen (PKMT) und Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) [145]. Lysine können ein, zwei oder drei kovalent gebundene Methylgruppen aufweisen (Abbildung 6 a) [146]. Arginine hingegen werden entweder monomethyliert oder symmetrisch bzw. asymmetrisch dimethyliert (Abbildung 6 b) [143]. Die Protein-Methylierung ist eine sehr stabile Modifikation [86]. Im Jahr 2007 wurde die erste und bisher einzige Demethylase *in vivo* beschrieben [147]. Es wird allerdings kontrovers diskutiert, ob die *Jumonji domain-containing 6* (JMJD6)-Demethylase sowohl Arginine als auch Lysine oder ausschließlich Lysine demethyliert [147-149].

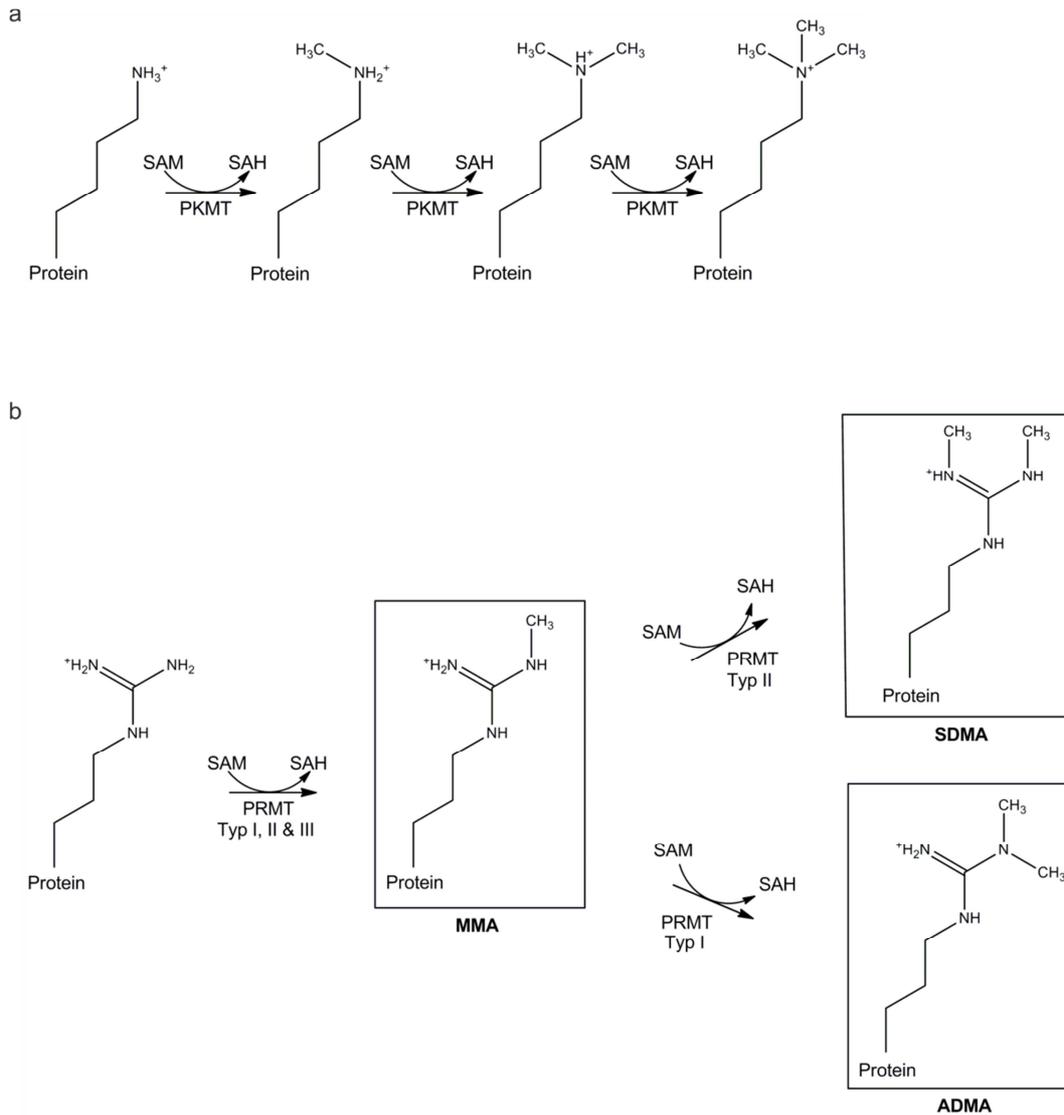


Abbildung 6: Mechanismen der Protein-Lysin-Methylierung und Protein-Arginin-Methylierung. **a**, Protein-Lysin-Methyltransferasen (PKMT) können die Bindung von ein, zwei oder drei Methylgruppen an ein Lysin katalysieren. **b**, Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) des Typs I katalysieren sowohl Monomethylarginin (MMA) als auch asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), Enzyme des Typs II katalysieren sowohl MMA als auch symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) und Typ III-Enzyme katalysieren ausschließlich MMA als Endprodukt. SAM: S-Adenosylmethionin, SAH: S-Adosylhomocystein.

2.3.3.1 Die Familie der Protein-Arginin-Methyltransferasen

In Säugerzellen gibt es drei verschiedene Arten der Arginin-Methylierung [143]: Die bislang meist verbreitete Form ist das Omega-N^G,N^G-Dimethylarginin [asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)], bei der zwei Methylgruppen an ein terminales Stickstoffatom der Guanidin-Gruppe angelagert werden. Darüber hinaus gibt es das Omega-N^G,N^G-Dimethylarginin [symmetrisches Dimethylarginin (SDMA)] mit je einer Methylgruppe pro terminalem Stickstoffatom, und das Omega-N^G-Monomethylarginin (MMA), bei dem ein terminales Stickstoffatom eine Methylgruppe besitzt (Abbildung 6 b).

Katalysiert werden diese Formen der Arginin-Methylierung durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) [143]. Sie methylieren vorzugsweise Proteinregionen, die Glycin- und Arginin-reich sind [143]. Diese Sequenzbereiche werden als GAR-Motive oder, ihrer jeweiligen Sequenz entsprechend, als RG-, RGG- oder GRG-Boxen bezeichnet [150]. Sowohl die Abfolge der Aminosäuren als auch die Länge dieser Motive ist variabel [151-155]. Bisher sind neun verschiedene PRMTs bekannt, die in drei Typen unterschieden werden [156]: Typ I-Enzyme katalysieren Monomethylierung und asymmetrische Dimethylierung, Typ II-Enzyme katalysieren Monomethylierung und symmetrische Dimethylierung, und Typ III-Enzyme katalysieren als Endprodukt ausschließlich ein Monomethylarginin (Abbildung 6 b). Bisher ist kein Enzym bekannt, das sowohl ADMA als auch SDMA katalysiert [143]. Zur Gruppe der Typ I-Enzyme gehören PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6 und PRMT8 [150]. PRMT1 ist die erste in Säugern identifizierte Protein-Arginin-Methyltransferase [157]. Sie besitzt eine weite Substratspezifität mit einer Präferenz für Arginine, die von einem oder mehreren Glycin-Resten umgeben sind [154, 158]. PRMT8 ist das einzige membranassoziierte PRMT-Enzym [159]. Es weist eine hohe Homologie zu PRMT1 auf [143, 159]. Die Typ II-Enzyme umfassen PRMT5, PRMT7 und PRMT9 [150, 160]. PRMT5 war die erste und lange Zeit einzig bekannte Typ II-Arginin-Methyltransferase [161]. Alle drei Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese des Spleißosoms [160, 162, 163]. Sowohl PRMT5 als auch PRMT7 methylieren Sm-Proteine (vgl. 2.2.1.1) [69, 163]. PRMT9 hingegen methyliert das Spleißosom-assoziierte Protein SAP145 und fördert so die Interaktion mit dem *survival of motor neuron* (SMN)-Protein [160]. PRMT7 hat zudem eine Typ III-Aktivität und ist bislang das einzige bekannte Enzym dieser Klasse [164]. PRMT1 und PRMT5 gehören zu den wichtigsten Arginin-Methyltransferasen, ein entsprechender *Knockout* ist letal [165, 166].

Die katalytische Einheit von Protein-Arginin-Methyltransferasen beinhaltet drei Domänen [145]: die Methyltransferasedomäne (MTase-Domäne) inklusive der SAM-Bindestelle, die β -Faltblatt-Domäne und die Dimerisierungsdomäne. Substratproteine lokalisieren an die Bindetasche zwischen MTase- und β -Faltblatt-Domäne [145]. Die MTase-Domäne ähnelt strukturell der Rossmann-Faltung, bei der die ersten beiden β -Faltblatt-Einheiten jeweils über eine α -Helix mit dem nächsten β -Faltblatt verbunden sind [167]. Diese konservierte Struktur wird in die Motive I, post-I, II und III unterteilt (Abbildung 7) [145, 167, 168]. Das aktive Zentrum der MTase-Domäne wird durch zwei verschiedene Strukturen gebildet: den so genannten Threonin-Histidin-Tryptophan-Loop (*THW-Loop*) und den *Double-E-Loop* (Abbildung 7) [169]. Letzterer besteht aus zwei hoch konservierten Glutamat-Resten, deren negative Ladung für die richtige Orientierung der positiv geladenen Guanidgruppe des Arginin-Restes des Substrats sorgt [156, 168, 169]. Zur Aktivierung müssen Protein-Arginin-Methyltransferasen Oligomere, mindestens Dimere, bilden [156, 170-172]. Die Dimerisierung erfolgt über die Dimerisierungsdomäne des einen Monomers mit der äußeren Oberfläche der MTase-

Domäne des anderen Monomers [156].

Die neun PRMT-Formen unterscheiden sich vor allem im N-Terminus hinsichtlich Länge und Sequenz (Abbildung 7) [156]. Diese Variabilität könnte zum einen für die Substratspezifität verantwortlich sein oder aber die subzelluläre Lokalisation oder Protein-Protein-Interaktionen regulieren [156]. Darüber hinaus variiert die Struktur des aktiven Zentrums, wodurch ebenfalls die Substratspezifität bestimmt werden könnte [156].



Abbildung 7: Schematische Darstellung der neun Formen der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT1-9) in Säugetieren. Die katalytische Einheit ist in grau dargestellt, die N-terminale Region in orange. Die Methyltransferase-Motive I, post-I, II, III und der *THW-Loop* sind in grün abgebildet, wobei die entsprechenden Motive in manchen Formen mit geringer oder keiner Sequenzähnlichkeit schwach grün dargestellt sind. SH3: SH3-Domäne, Zn: Zink-Finger-Motiv, TPR: Tetratricopeptid-Wiederholung, AS: Aminosäuren. Republiziert mit der Genehmigung von Academic Press, von [156]; Genehmigung erteilt durch das Copyright Clearance Center, Inc..

Die Regulation der Arginin-Methylierung erfolgt durch verschiedene Faktoren [150]: posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung), Assoziation mit Regulatorproteinen (z. B. WD45, siehe 2.3.3.1.1), subzelluläre Kompartimentierung oder Faktoren, welche die Substratbindung beeinflussen. Hinsichtlich der Regulation von Protein-Protein-Interaktionen ist die so genannte Tudor-Domäne zu erwähnen. Proteine mit dieser Domäne binden selektiv methylierte Arginine (und Lysine) [150]. Diese Domänen besitzen eine konservierte Struktur und Sequenz aus rund 50 Aminosäuren und kommen meist mehrmals innerhalb eines Proteins vor [150]. Sie weisen ein

aromatisches Strukturmotiv auf, welches mit Methylarginin- (bzw. Methyllysin)-Motiven interagiert [150]. Im Säuger genom sind mehr als 30 Proteine codiert, die eine solche Tudor-Domäne beinhalten [150]. Die erste Tudor-Domäne wurde im bereits erwähnten SMN-Protein im Zusammenhang mit der U-snRNP-Biogenese beschrieben [173]. Sie bindet Sm-Proteine, die zuvor von PRMT5 methyliert wurden [76, 173] (vgl. 2.2.1.1).

2.3.3.1.1 Protein-Arginin-Methyltransferase 5

Zum ersten Mal beschrieben wurde die Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5/JBP1) im Jahr 1999 als humanes Homolog der Hefe-Proteine Skb1 und Hsl7p und Interaktionspartner der Janus-Kinase [161]. Zwei Jahre später wurde JBP1 als Typ II-Methyltransferase identifiziert und daraufhin in PRMT5 umbenannt [174].

In Säugetieren agiert PRMT5 sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern [143]. Im Nukleus dient PRMT5 beispielsweise als Bindungspartner des *coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator* (COPRS) und methyliert den Histon-Argininrest H4R3 [175]. Des Weiteren fungiert die Methyltransferase als Transkriptionsregulator, indem sie unter anderem den Elongationsfaktor SPT5 methyliert [176, 177]. Im Cytoplasma reguliert PRMT5 unter anderem die U-snRNP-Biogenese durch Methylierung der Sm-Proteine B, D1 und D3 [69]. Durch Methylierung von Nucleolin ist sie zudem in die Ribosomensynthese involviert [90] und steuert darüber hinaus den MAP-Kinase-Signalweg durch Methylierung von RAF-Proteinen [178]. PRMT5 besitzt onkogene Eigenschaften und ist in zahlreichen humanen Tumoren hochreguliert, z. B. in Lungen- [179] und Brustkrebs [180] oder auch in Lymphomen [181]. Die genauen zelltransformierenden Mechanismen sind nicht bekannt, allerdings spielt PRMT5 unter anderem eine Rolle im Zelltod, Zellwachstum und in der Proliferation [182].

PRMT5 dimethyliert Arginin-Reste sowohl in GAR-reichen [174] als auch in Prolin-Glycin- und Methionin-reichen Regionen (PGM-Motive) [183]. Die in U-snRNPs beinhaltenen und von PRMT5 methylierten Sm-Proteine B, D1 und D3 verfügen über zahlreiche dieser Motive: Das Sm-Protein B besitzt über die gesamte Proteinsequenz verteilt GAR-Motive (Abbildung 8). Im C-Terminus weist es zudem zahlreiche PGM-Motive auf. Der C-Terminus von SmD1 beinhaltet eine Aneinanderreihung an GAR-Motiven, so genannte RG-Boxen. SmD3 hingegen weist mehrere GAR-Motive über die gesamte Sequenz verteilt auf (Abbildung 8).

	1	MTVGKSSKML	QHIDYRMRCI	LQDGRIFIGT	FKAFDKHMNL	IILCDCDEFK
	51	IKPKNSKQAE	REEKRVLGLV	LLRGENLVSM	TVEGPPPKDT	GIARVPLAGA
SmB	101	AGGPGIGRAA	GRGIPAGVPM	PQAPAGLAGP	VRGVGGPSQQ	VMTFQGRGTV
	151	AAAAAATAS	IAGAPTQYPP	GRGGPPPMG	RGAPPGMMG	PPGMRPPMG
	201	PPMGIPPGRG	TPMGMPPMG	RPPPPGMRGL	L	
	1	MKLVRFMKL	SHEVTIELK	NGTQVHGTT	GVDVSMNTHL	KAVKMTLKNR
SmD1	51	EPVQLETLSI	RGNIRYFIL	PDSLPLDTLL	VDVEPKVSK	KREAVAGRGR
	101	GRGRGRGRGR	GRGRGGPRR			
	1	MSIGVPIKVL	HEAEGHIVTC	ETNTGEVYRG	KLIEAEDNMN	QMSNITVTY
SmD3	51	RDGRVAQLEQ	VYIRGSKIRF	LILPDMLKNA	PMLKSMKNKN	QGSAGRGKA
	101	AILKAQVAAR	GRGRGMGRGN	IFQKRR		

Abbildung 8: GAR- und PGM-Motive in den Proteinsequenzen der Sm-Proteine B, D1 und D3. SmB besitzt mehrere GAR-Motive (rot) über die gesamte Sequenz verteilt und PGM-Motive (grün) überwiegend am C-Terminus lokalisiert. SmD1 und SmD3 weisen ausschließlich GAR-Motive (rot) auf, die in SmD1 überwiegend im C-Terminus lokalisiert sind.

Strukturell besteht PRMT5 aus einer C-terminalen katalytischen Einheit und einem N-terminalen TIM-Barrel [184]. Letzteres ist eine konservierte Proteinstruktur, die aus acht α -Helices und acht parallelen β -Faltblättern besteht [184]. Die Aktivität von PRMT5 wird durch das Methylosom-Protein 50 (MEP50/WD45/WDR77) reguliert [64, 185], welches im Folgenden als WD45 bezeichnet wird. Ferner sorgt WD45 für die korrekte Orientierung des Substrates zur katalytischen Einheit der Methyltransferase [184, 185]. Es gehört zur WD40-Domänen-Proteingruppe, die durch ein 40 Aminosäure großes Strukturmotiv charakterisiert ist [186]. Dieses weist eine zirkuläre siebenteilige β -Propeller-Struktur auf, welche jeweils mit einem Tryptophan-Asparaginsäure (WD)-Dipeptid endet [186]. Im WD45-Protein selbst tragen nur zwei der sieben Faltblätter das WD-Motiv [184].

Im katalytisch aktiven Zustand bildet PRMT5 Tetramere [172]. Dabei interagiert die Dimerisierungsdomäne eines Monomers via Asp-491 und Arg-488 über Salzbrücken (Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Interaktionen) mit Arg-488 und Asp-491 eines anderen Monomers (Abbildung 9 b) [184]. Zusammen mit WD45 formiert das PRMT5-Tetramer ein Heterooktamer, das ca. 435 kDa groß ist [184]. Dabei wird das PRMT5-Tetramer auf der äußeren Oberfläche mit vier WD45-Molekülen dekoriert [184]. WD45 bindet dabei direkt an die TIM-Barrel-Domäne (Abbildung 9 a) [184].

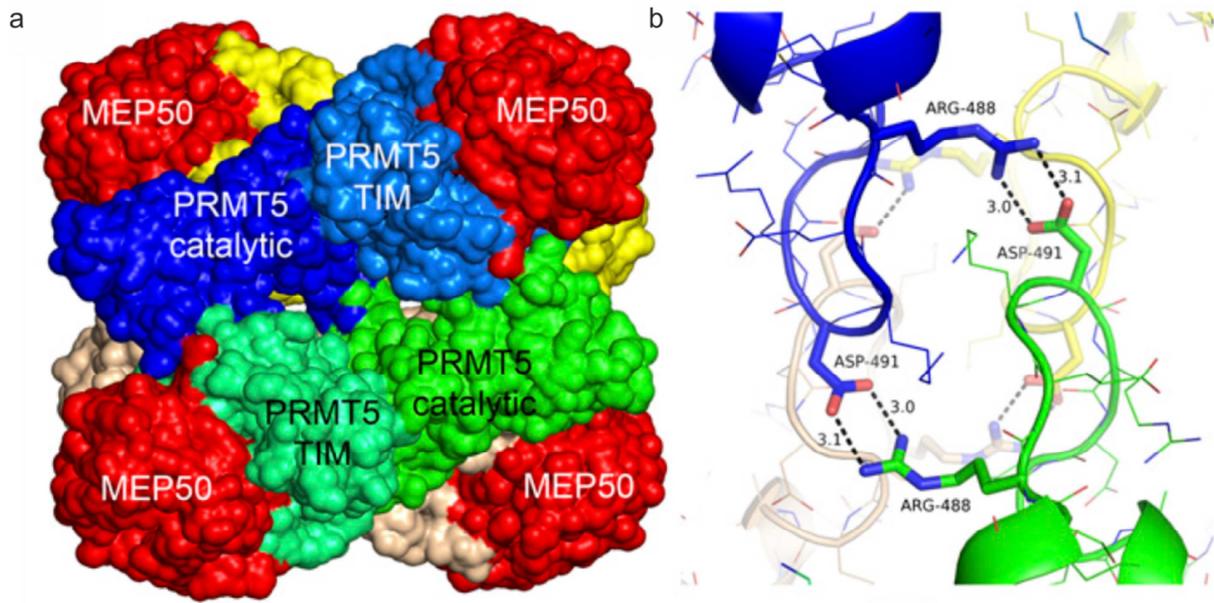


Abbildung 9: Struktur des humanen PRMT5-WD45-Heterooktamers. a, PRMT5-Monomere bestehend aus der katalytischen Einheit und der TIM-Barrel-Struktur sind in blau, grün, gelb und beige dargestellt. WD45- bzw. MEP50-Moleküle (rot) flankieren die äußere Oberfläche des PRMT5-Tetramers und interagieren mit der N-terminalen TIM-Barrel-Domäne. b, Die Dimerisierungsdomäne des Monomers 1 (blau) interagiert über Asp-491 und Arg-488 direkt über Salzbrücken mit Arg-488 und Asp-491 des Monomers 2 (grün). Übernommen aus Antonyamy *et al.*, 2012 [184].

Die PRMT5-WD45-Interaktion kann durch die Phosphorylierung von PRMT5 gestört werden, wodurch die Aktivität der Methyltransferase inhibiert wird [187]. Darüber hinaus gibt es Bindeproteine, die als Modulatoren des PRMT5-WD45-Subkomplexes fungieren. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist der nukleäre *SWI/SNF chromatin remodeling complex*. Durch Interaktion dieses Komplexes mit dem PRMT5-Komplex wird dessen Methylierungsaktivität bezüglich der Histon-Substrate H4 und H3 erhöht und so die Transkription von Zellzyklus-Regulator- und Tumorsuppressor-Genen verringert [188]. Im Cytoplasma interagiert der PRMT5-WD45-Subkomplex entweder mit p1Cln, welches die Sm-Proteine zur Methyltransferase rekrutiert (vgl. 2.2.1.1), oder mit RIOK1, welches das in die Ribosomensynthese involvierte Protein Nucleolin rekrutiert [90]. Beide Adapterproteine konkurrieren um die Bindung an PRMT5 und regulieren auf diese Weise die Substratspezifität von PRMT5 [90].

3 ZIELSETZUNG

Im Rahmen meiner Masterarbeit konnte eine Interaktion zwischen der Serin/Threonin-Proteinkinase ULK1 und dem PRMT5-Komplex ermittelt und bestätigt werden. Darüber hinaus wurde pICln als neues Phospho-Substrat von ULK1 *in vitro* identifiziert [189]. In der vorliegenden Dissertation sollte die Interaktion zwischen ULK1 und dem Methylosom umfassend untersucht und charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte zum einen die *in vitro*-Phosphorylierung von pICln durch ULK1 näher analysiert und zum anderen die Phosphorylierung *in vivo* überprüft werden. Um die spezifischen ULK1-abhängigen Phosphorylierungsstellen in pICln zu identifizieren, sollten massenspektrometrische Phosphorylierungsanalysen durchgeführt und entsprechende phosphorylierungsinhibierende und -imitierende Mutationen kloniert werden. Neben ULK1 sollte die putative Phosphorylierung von pICln durch die anderen ULK-Familienmitglieder geprüft werden.

Für die Erforschung der physiologischen Relevanz der ULK1-bedingten pICln-Phosphorylierung im Rahmen der U-snRNP-Biogenese sollte neben den Phosphorylierungsmutanten ein spezifischer ULK1/2-Inhibitor verwendet werden. Der Einfluss der Phosphorylierung sollte dazu hinsichtlich der folgenden fünf Aspekte analysiert werden:

1. der Komplexzusammensetzung des Methylosoms
2. der Methylierung der Sm-Proteine durch PRMT5
3. der Interaktion von pICln mit den Sm-Proteinen
4. der Aktivität des Spleißosoms
5. der Motoneuronenentwicklung im *D. rerio*-Embryo

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in Analysequalität von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Roth oder Roche bezogen. Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde mithilfe einer Milli-Q Biocel-Filteranlage aufbereitet und wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

4.1.1 Radiochemikalien

[γ - ³² P]Adenosin-5'-Triphosphat, 10 μ Ci/ μ l (SRP-301)	Hartmann Analytic
L-[³⁵ S]Methionin, 10 μ Ci/ μ l (SRM-01)	Hartmann Analytic
Adenosyl-L-Methionin, S-[Methyl- ³ H], 1 μ Ci/ μ l (ART 0288A)	Hartmann Analytic

4.1.2 Chromatographische Matrices

Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare
GFP-Trap®_A	ChromoTek
HiLoad 16/600 Superdex 200	GE Healthcare
Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare
75 μ m I.D., 25 cm PepMap™ C18-Säule	Dionex

4.1.3 Antikörper

4.1.3.1 Primäre Antikörper

mouse anti-ATG13	M-183-3, MBL
rabbit anti-ATG101	SAB4200175, Sigma-Aldrich
rabbit anti-FIP200/RB1CC1	A301-536A, Bethyl
mouse anti-GAPDH	ab8245, abcam
rat anti-GFP	3H9, Chromotek
rabbit anti-pICln	Dr. Matthias Grimm
rabbit anti-PRMT5	2252, CST
rabbit anti-SmD1	ab79977, abcam
rabbit anti-SmD2	SAB2102257, Sigma-Aldrich
rabbit anti-SmE	NBP2-43792, Novus Biologicals
rabbit anti-SmF	SAB2102258, Sigma-Aldrich
rabbit anti-SmG	HPA064152, Sigma-Aldrich
mouse anti- α -Tubulin	T5168, Sigma-Aldrich
rabbit anti-ULK1	8054, CST
rabbit anti-ULK3	ab124947, abcam
rabbit anti-WD45/MEP50	2823, CST
mouse anti-znp-1	znp-1, DSHB

4.1.3.2 Sekundäre Antikörper

goat anti-mouse IgG (H+L) IRDye [®] 680 LT	LI-COR Biosciences
goat anti-mouse IgG (H+L) IRDye [®] 800 CW	LI-COR Biosciences
goat anti-rabbit IgG (H+L) IRDye [®] 680 LT	LI-COR Biosciences
goat anti-rabbit IgG (H+L) IRDye [®] 800 CW	LI-COR Biosciences
goat anti-rat IgG (H+L) IRDye [®] 800 CW	LI-COR Biosciences
goat anti-mouse Alexa Fluor [®] 647	Jackson ImmunoResearch

4.1.4 Proteine

Flag-PRMT5/His-WD45	SRP0145, Sigma-Aldrich 31356, Active Motif
GST-ULK1, aktiv	SRP5096, Sigma-Aldrich
GST-ULK2, aktiv	SRP5097, Sigma-Aldrich
His-ULK3, aktiv	SRP5098, Sigma-Aldrich

4.1.5 Enzyme

2x Real-Time PCR MasterMix	PrimerDesign
Lambda Proteinphosphatase	New England BioLabs
Pfu-DNA-Polymerase	Promega
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
PreScission Protease	GE Healthcare
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)</i>	Roche
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific

4.1.6 Molekulargewichts- und Längenstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa)	Thermo Fisher Scientific
Gelfiltrationsmarker: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), RNase (14 kDa)	GE Healthcare

4.1.7 Zelllinien und Mikroorganismen

4.1.7.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) gal [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ-

4.1.7.2 Humane Zelllinien

Jurkat (ACC 282)	Humane T-Lymphomzellen	DMSZ
HEK293T (CRL-1573)	Humane Embryonale Nierenzellen	ATCC
Flp-In TM 293 T-REX TM	Humane Embryonale Nierenzellen	Invitrogen
Flp-In TM 293 T-REX TM -GFP(vec)	Humane Embryonale Nierenzellen	Dr. Antje Löffler
Flp-In TM 293 T-REX TM -GFP-ULK1	Humane Embryonale Nierenzellen	Dr. Antje Löffler
Flp-In TM 293 T-REX TM -GFP- ULK1/ΔCTD	Humane Embryonale Nierenzellen	Dr. Antje Löffler

4.1.7.3 Medien und Zusätze für die eukaryotische Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/L Glucose	Gibco
RPMI 1640	Gibco
OptiMEM	Gibco
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)	Gibco
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco
Fötale Kälberserum (FCS)	GE Healthcare
Tetracyclinfreies FCS	Biochrom
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Trypsin-EDTA	Gibco

4.1.7.3.1 Medienzusammensetzung für eukaryotische Zellen

HEK293T-Zelllinien	DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Jurkat-Zellen	RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) HEPES und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

4.1.7.3.2 Medienzusammensetzung für die Bakterienkultur

<i>Lysogeny broth</i> -Medium (LB)	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl
<i>Superbroth</i> -Medium (SB)	3,5 % (w/v) Trypton, 2 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl

Durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar wurden entsprechende Festmedien hergestellt. Zur Selektion wurden 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin verwendet.

4.1.8 Oligonukleotide

Primer-DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen. 25 nmol lyophilisierte Oligonukleotide wurden in ddH₂O auf eine Konzentration von 100 µM resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Gen	Sequenz
pICln	Fwd 5' -GGATCCATGAGCTTCCTCAAAAGTTTCCC-3' Rev 5' -GTCTCGAGTCAGTGATCAACATCTGCATCC-3'
pICln ^{S193, 195, 197A}	Fwd 5' -AGATTAGAAGGAATGCTTGCTCAGGCTGTGGCCAGCCAGTATAATATG-3' Rev 5' -CATATTATACTGGCTGGCCACAGCCTGAGCAAGCATTTCCTTCTAATC-3'
pICln ^{S193, 195, 197D}	Fwd 5' -GATTAGAAGGAATGCTTGATCAGGATGTGGACAGCCAGTATAATATG-3' Rev 5' -CATATTATACTGGCTGTCCACATCCTGATCAAGCATTTCCTTCTAATC-3'
SmB	Fwd 5' -ATGAATTCATGACGGTGGCAAGAGC-3' Rev 5' -ATGCGGCCGCTCAAAGAAGGCCTCGCATC-3'
SmD3	Fwd 5' -ATGAATTCATGTCTATTGGTGTGCCG-3' Rev 5' -ATCTCGAGTTATCTTCGCTTTTGAAAGATG-3'
SmG	Fwd 5' -ATGGAATTCATGAGCAAAGCTCACCT-3' Rev 5' -ATGCTCGAGTTATCGTTCCAAGGCTT-3'
Gespleißte mRNA	Fwd 5' -TGAGGAGGCTTTTTTGGAGG-3' Rev 5' -TTCACTAATCGAATGGATCTGTC-3'
Ungespleißte mRNA	Fwd 5' -TGAGGAGGCTTTTTTGGAGG-3' Rev 5' -CAATACTACTTCTTGTGGGTTGG-3'
hGH1	Fwd 5' -TCTTCCAGCCTCCCATCAGCGTTTGG-3' Rev 5' -CAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCT-3'

ULK1 (AS 100-132, Oligo1)	Fwd 5'-TGGGCAAGTTCGAGTTCTCC-3' Rev 5'-CTCCAAATCGTGCTTCTCGC-3'
ULK1 (AS 363-380, Oligo2)	Fwd 5'-ATCACCCCTTCTCGATGCC-3' Rev 5'-CACGGGTGGGGATTTCCTG-3'
ULK1 (AS 1084-1125, Oligo3)	Fwd 5'-AGATGTCCAGCACCGTGAG-3' Rev 5'-CACAGCTTGCACTTGGTGAC-3'
18S	Fwd 5'-GCCGCTAGAGGTGAAATCTTG-3' Rev 5'-CATTCTGGCAAATGCTTTCG-3'

Morpholino-Oligomere wurden von der Firma Gene Tools bezogen. 300 nmol lyophilisierte Oligonukleotide wurden in ddH₂O auf eine Konzentration von 1 mM resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Gen	Sequenz
ulk1a	Fwd 5'-ACTCGTACTTTCCGATGCTTTCCAT-3'
ulk1b	Fwd 5'-CGAATTTCCCGACAGTCTCCATCTC-3'
Kontrolle	Fwd 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

Small interfering RNA (siRNA) gegen ULK1 (L-005049-00-0010, SMARTpool, ON-TARGETplus) sowie der Transfektionsindikator siGLO (D-001630-02) wurden von GE Dharmacon bezogen.

4.1.9 Plasmide

pcDNA5-FRT-TO	-	Invitrogen
pET-15b	His-Tag	Merck Millipore
pET-21a	-	Merck Millipore
pET-28a	His-Tag	Merck Millipore
pGEX-6P-1	GST-Tag	GE Healthcare
pHA	HA-Tag (pcDNA3.0 von Invitrogen über PCR modifiziert mit HA-Tag am N-Terminus)	Dr. Matthias Grimmeler, Dr. Oliver Plöttner

4.1.10 Plasmidkonstrukte

Konstrukt	Referenz
pcDNA5-FRT-TO-GFP	Löffler <i>et al.</i> , 2011
pcDNA5-FRT-TO-GFP-ULK1	Löffler <i>et al.</i> , 2011
pcDNA5-FRT-TO-GFP-ULK1/ Δ CTD	Löffler <i>et al.</i> , 2011
pcDNA5-FRT-TO-GFP-pICln	Diese Arbeit
pcDNA5-FRT-TO-GFP-pICln S193, 195, 197A	Diese Arbeit
pcDNA5-FRT-TO-GFP-pICln S193, 195, 197D	Diese Arbeit
pET-28a-pICln	Diese Arbeit
pET-28a-pICln S193, 195, 197A	Diese Arbeit
pET-28a-pICln S193, 195, 197D	Eigene Arbeitsgruppe/Martin Voss
pET-28a-SmB	Eigene Arbeitsgruppe/Martin Voss
pET-28a-SmD1	Dr. Matthias Grimmer
pET-28a-SmD3	Eigene Arbeitsgruppe/Martin Voss
pET-28a-SmG	Eigene Arbeitsgruppe/Martin Voss
pGEX6P-1-PRMT5	Guderian <i>et al.</i> , 2011
pGEX6P-1-WD45	Guderian <i>et al.</i> , 2011
pGEX-6P-1-pICln	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-pICln S193, 195, 197A	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-pICln S193, 195, 197D	Diese Arbeit
pRFP-C-RS-ULK1 FI333957	OriGene
pRFP-C-RS-ULK1 FI333958	OriGene
pRFP-C-RS-ULK1 FI333959	OriGene
pRFP-C-RS-ULK1 FI333960	OriGene
pRFP-C-RS TR30015	OriGene

4.1.11 Weitere Materialien

6x DNA Loading Dye	Fermentas
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Entwickler G150	AGFA
Fixierer G354	AGFA
Hyperfilm MP	GE Healthcare
HDGreen® Safe DNA Dye	Intas Science Imaging
Immobilon-FL Transfermembran	Merck Millipore

Intensifying screens BioMax® Transcreen® LE
 Protease Inhibitor Cocktail
 ULK1/2-Inhibitor MRT67307

 Whatman® Gel Blot GB003

Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 MRC PPU, College of Life Sciences,
 University of Dundee, Scotland
 Sigma-Aldrich

4.1.12 Geräte

7500 Real-Time PCR-System
 ÄKTApurifier
 Avanti JXN-26
 Axio Observer A1
 Biacore T200
 CO₂-Inkubator MCO-20AIC
 DM IRE2
 GeneAmp® PCR System 9700
 Heraeus™ Fresco™ Microcentrifuge
 Heraeus™ Megafuge™ 40R
 Heraeus™ Pico™ 17
 HERAsafe® Sicherheitswerkbank
 Inkubationsschüttler CERTOMAT BS-1
 Inkubationsschüttler Infors HT
 LTQ Orbitrap Velos Pro
 LightCycler 1.5
 NanoDrop® 1000
 Odyssey® Infrared Imaging System
 Synergy MX Reader
 Thermomixer Comfort
 U3000 nano-flow HPLC

Applied Biosystems
 GE Healthcare
 Beckman Coulter
 Zeiss
 GE Healthcare
 Sanyo
 Leica
 Applied Biosystems
 Thermo Fisher Scientific
 Thermo Fisher Scientific
 Thermo Fisher Scientific
 Heraeus
 B. Braun Biotech
 Ecotron
 Thermo Fisher Scientific
 Roche
 Peqlab
 LI-COR® Biosciences
 BioTek
 Eppendorf
 Thermo Fisher Scientific

4.1.13 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Amidoschwarz
Amidoschwarz-Entfärbelösung	90 % (v/v) Methanol; 3 % (v/v) Essigsäure
Blocklösung WB	5 % Milchpulver in 1x TBS-T, 0,05 % Natriumazid
Blocklösung IF	1 % (v/v) FCS + 0,1 % (v/v) Tween in 1x PBS
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,5 % (w/v) Brilliant Blau G250
<i>E. coli</i> Aufschlusspuffer	300 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 0,01 % Igepal; 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette/50 ml
Fixierlösung, 10 %	10 % Formaldehydlösung (37 %); 0,65 % (w/v) di-Natriumhydrogenphosphat; 0,4 % (w/v) Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat; pH 7
Immunpräzitationspuffer	0,01 % (v/v) Igepal in 1x PBS
Interaktionspuffer	300 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1mM DTT; 0,01 % (v/v) Igepal
Kinase-Puffer, 2x	50 mM NaCl; 25 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 2 mM CaCl ₂
Kinase-Waschpuffer	300 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 0,01 % (v/v) Igepal
Laufpuffer ÄKTA	150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5
Laufpuffer Biacore	300 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA Lysepuffer 150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1 % (w/v) Triton X-100; 1x Protease Inhibitor Cocktail
Methylierungspuffer, 10x	500 mM Tris pH 7,5; 20 mM EDTA; 20 mM EGTA
Phosphorylierungspuffer A, 10x	50 mM Tris pH 7,5; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 75 mM Magnesiumacetat
PBT	0,5 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS
PBT + 10 % FCS	1 % (w/v) BSA; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 10 % FCS in 1x PBS
Probenpuffer Biacore	300 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1mM DTT; 0,01 % (v/v) Igepal; 1 mg/ml BSA
Roeder A-Puffer	10 mM KCl; 10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT; 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette/50 ml

SDS-Probenpuffer, 2x	125 mM Tris pH 7,5; 17 % (w/v) Glycerin; 4,1 % (w/v) SDS; 0,001 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 6x	375 mM Tris pH 7,5; 25,8 % (w/v) Glycerin; 12,3 % (w/v) SDS; 0,06 % Bromphenolblau; 6 % (v/v) β -Mercaptoethanol; pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 10x	209 mM Tris pH 7,5; 41 % (w/v) Glycerin; 7,7 % (w/v) SDS; 0,003 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol; pH 6,8
SDS-Tris-Tricin-Gelpuffer, 3x	3 M Tris pH 8,45; 0,3 % (w/v) SDS
SDS-Tris-Tricin-Kathodenpuffer	100 mM Tris pH 8,9; 100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Tris-Tricin-Anodenpuffer	200 mM Tris pH 8,9
SDS-Tris-Glycin-Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Tris-Glycin-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris pH 7,5; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer	2 M Tris pH 7,5; 1 M Essigsäure; 0,05 M EDTA; pH 8,5
TBS-T	1,5 M NaCl; 100 mM Tris pH 7,6; 1 % (v/v) Tween20
TFB I	100 mM KCl; 10 mM CaCl_2 ; 30 mM KOAc pH 6,0; 15 % (v/v) Glycerin; auf pH 6,1 mit HOAc einstellen, autoklavieren, 50 mM MnCl_2 (steril-filtriert) zugeben, Lagerung bei 4 °C
TFB II	75 mM CaCl_2 ; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/v) Glycerin; auf pH 7,0 mit KOH einstellen, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 1mM EGTA
Wet-Transfer-Puffer	43,58 mM Tris pH 7,5; 39 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mithilfe von so genannten Oligonukleotid-Primern. Diese Reaktion lässt sich in drei Schritte einteilen: Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA bei hohen Temperaturen, um die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen. Durch Verminderung der Temperatur auf einen Primer-spezifischen Wert wird die Hybridisierung dieser im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide mit der DNA ermöglicht (Primer-Anlagerung). Die genaue Temperatur wird durch die Länge und Sequenz der Primer bestimmt. Zuletzt erfolgt die Elongation, welche die Amplifikation der DNA-Sequenz mithilfe der DNA-Polymerase beschreibt. Letztere amplifiziert dabei ausgehend von den Primern die jeweils komplementären Stränge in 5'-3'-Richtung. Das Temperaturoptimum der Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase liegt bei 72 °C. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus wird eine exponentielle Vermehrung der gewünschten DNA-Sequenz erreicht.

Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 20 µl und bestand aus den folgenden Komponenten:

Komponente	Volumen	Finale Menge/Konz.
5x Phusion-Puffer	4 µl	1X
Plasmid-DNA (100-200 pg)	x µl	100-200 pg
0,5 µM Forward Primer	5 µl	125 nM
0,5 µM Reverse Primer	5 µl	125 nM
200 µM dNTP's	0,4 µl	4 µM
Phusion Hot Start II (2 U/µl)	0,2 µl	0,4 Units
Nuklease-freies Wasser	auf 20 µl	

Anschließend wurde das folgende PCR-Programm durchgeführt:

	Temp.	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden
	98 °C	10 Sekunden (Denaturierung)
30 Zyklen	x °C	10 Sekunden (Anlagerung)
	72 °C	15-30 s/kb (Elongation)
Finale Elongation	72 °C	7 Minuten
Ende	12 °C	∞

Zur Überprüfung der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt [189].

4.2.1.1.1 Mutagenese-PCR

Um eine Punktmutation und somit einen Aminosäure-Austausch innerhalb eines Gens zu erzeugen, wurde eine so genannte Mutagenese-PCR durchgeführt. Diese erfolgte mithilfe der Pfu-DNA-Polymerase und Mutation-beinhaltenen Primern. Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 25 µl und bestand aus den folgenden Komponenten:

Komponente	Volumen	Finale Menge/Konz.
10x Pfu-Puffer + MgSO ₄	2,5 µl	1X
Plasmid-DNA (50 ng/µl)	1 µl	50 ng
100 ng/µl Forward Primer	0,625 µl	62,5 ng
100 ng/µl Reverse Primer	0,625 µl	62,5 ng
10 mM dNTPs	0,5 µl	200 µM
Pfu-DNA-Polymerase (2-3 U/µl)	0,5 µl	1,25 Units
Nuklease-freies Wasser	auf 25 µl	

Anschließend wurde das folgende PCR-Programm durchgeführt:

	Temp.	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
	95 °C	30 Sekunden (Denaturierung)
18 Zyklen	55 °C	60 Sekunden (Anlagerung)
	68 °C	2 Min./kb (Elongation)
Finale Elongation	68 °C	2 Minuten
Ende	12 °C	∞

Um das Template-Plasmid aus dem Ansatz zu entfernen, wurde ein Restriktionsverdau mit 10 U Dpn1 für 1 Stunde bei 37 °C durchgeführt. Dpn1 verdaut methylierte DNA und zersetzt somit ausschließlich das Template-Plasmid, da die neu synthetisierten Plasmide nicht methyliert sind. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen (DH5 α).

4.2.1.1.2 Quantitative Real-Time (RT)-PCR

Für die Charakterisierung der ULK1-*Knockdown*-Zelllinien wurde zunächst die isolierte RNA mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine quantitative RT-PCR mittels des Power SYBR® Green PCR Master Mix nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung des Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR-Systems durchgeführt.

Zur Auswertung der Spleißexperimente wurde die mRNA wie in [190] und [191] beschrieben revers transkribiert. Die quantitative RT-PCR-Analyse wurde mittels des 2x Real-Time PCR Master Mix mit SYBR-Green unter Verwendung des LightCyclers 1.5 durchgeführt. Anschließend wurden die gespleißten und ungespleißten mRNA-Spezies normalisiert auf die hGH1-mRNA-Menge (Co-Transfektion des pXGH5-Plasmids) quantifiziert.

4.2.1.2 Generierung kompetenter Bakterienzellen

Um kompetente *E. coli* Bakterien herzustellen, wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Bakterien beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Daraufhin wurden 150 ml LB-Medium mit 900 μ l der Übernachtskultur versetzt und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von

0,45–0,55 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 9.400 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterien in 30 ml TFB I resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 90 Minuten mit anschließender Zentrifugation bei 4.800 g wurden die Bakterien in 6 ml eiskaltem TFB II vorsichtig resuspendiert. Die nun generierten kompetenten *E. coli* Bakterien wurden à 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80 °C gelagert [189].

4.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Die zu transformierenden Bakterien wurden auf Eis angetaut und anschließend 1 µl Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation der Bakterienzellen auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C und anschließende Abkühlung auf Eis. Daraufhin wurden 400 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und diese 45 Minuten bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 Sekunden bei 5.100 g, wurden 300 µl des Überstandes verworfen, die restlichen 100 µl resuspendiert und steril ausplattiert. Die Selektionsplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert [189].

4.2.1.4 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Verifikation der PCR wurde ein Agarosegel (0,5–2 %) verwendet. Zur Herstellung wurde eine entsprechende Menge Agarose in 40 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 3 µl HDGreen® Safe DNA Dye zugegeben und die gelöste Agarose in die Gelapparatur gegossen. Die Proben wurden mit entsprechender Menge 6x Loading Dye versetzt. Als Größenstandard wurden 5 µl des GeneRuler™ 1 kb bzw. 100 bp Plus DNA Ladder verwendet. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte bei 140 V für ca. 30 Minuten. Im Anschluss konnte das DNA-Gel unter UV-Licht ausgewertet und entsprechende Banden ausgeschnitten werden [189].

4.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen / Reinigung von Nukleinsäuren

Sowohl zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen als auch zur Reinigung von Nukleinsäuren im Anschluss an eine PCR wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Unter UV-Licht wurden die zu isolierenden Banden mithilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und die DNA anschließend nach Herstellerangaben aufbereitet. Dabei

wurden Enzyme, Nukleotide, Farbstoffe sowie Agarosereste entfernt [189].

4.2.1.6 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen wurden mithilfe eines Nanodrop® 1000 bestimmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zudem wurde die Reinheit der DNA ermittelt, wobei ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,8 eine reine DNA-Lösung beschreibt [189].

4.2.1.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.2.1.7.1 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung eines Gens in einen Vektor wurden sowohl der Zielvektor als auch die mithilfe der PCR amplifizierte DNA-Sequenz einem spezifischen Restriktionsverdau unterzogen. Dazu wurden in einem Ansatz von insgesamt 20 µl je 0,5–1 µg DNA mit 2 µl 10x FastDigest Puffer und 5 Units Restriktionsenzym gemischt. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben inaktiviert, damit sie die nachfolgende Ligation der Vektor-DNA mit dem Insert nicht behindern.

4.2.1.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit FastAP

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu vermeiden, wurde die Probe nach dem Restriktionsverdau mit 1 Unit FastAP behandelt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Alternativ wurde die Dephosphorylierung simultan zum Restriktionsverdau durchgeführt indem 1 Unit FastAP dem Ansatz zugegeben wurde. Das Enzym wurde anschließend durch 5-minütige Inkubation bei 75 °C inaktiviert.

4.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung eines Gens in einen Vektor wurde eine Ligation durchgeführt. In einem Ansatz von insgesamt 20 µl wurden 100 ng des Vektors mit einem 5-fachen molaren Überschuss an Insert, 2 µl 10x T4-Puffer und 5 Units T4 DNA-Ligase gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatzes zur Klonierung in kompetente *E. coli* Zellen (DH5α) transformiert [189].

4.2.1.9 Methoden zur DNA/RNA-Präparation und -Analyse

4.2.1.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien für analytische Untersuchungen wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) versetzt und Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur in das Kulturröhrchen überführt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttelapparat. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mithilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert [189].

4.2.1.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Um Plasmid-DNA im präparativen Maßstab zu isolieren, wurden 300 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur in einen Kolben überführt. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA mithilfe des NucleoBond® Xtra Maxi EF-Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers [189].

4.2.1.9.3 RNA-Isolation

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das NucleoSpin® RNA-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.2.1.9.4 Anfertigung von *E. coli* Glycerin-Kulturen

Zur Herstellung einer *E. coli* Glycerin-Kultur wurden 650 µl Bakteriensuspension zu 350 µl Glycerin (87 %) gegeben und anschließend mithilfe von flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Glycerin-Dauerkulturen wurden bei –80 °C gelagert [189].

4.2.1.9.5 Sequenzierung [192]

Zur Vorbereitung wurden die Proben in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit einer Konzentration von 20 – 100 ng/µl DNA angesetzt. Die Sequenzierung wurde durch die Firma GATC Biotech durchgeführt [189].

4.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer HERAsafe® Sicherheitswerkbank durchgeführt.

4.2.2.1 Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen wurde in zelllinienspezifischen Medien bei 37 °C, 5 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen, -schalen bzw. -platten unterschiedlicher Größe vollzogen. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Abnahme des Mediums, einmaliges Waschen mit PBS und Ablösung der Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA. Die Zellen wurden sofort oder nach Zentrifugation bei 1.230 g und 4 °C für 5 Minuten in geeigneter Verdünnung bzw. Zellzahl ausgesät. Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt [189].

4.2.2.2 Kryokonservierung humaner Zellen

Für das Einfrieren eukaryotischer Zellen wurde ein Einfriermedium bestehend aus 90 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt und auf 4 °C gekühlt. Die Zellen wurden bei 820 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, in einer geeigneten Menge Einfriermedium resuspendiert und anschließend à 1 ml mit einer Zelldichte von $\sim 1 \times 10^7$ Zellen/ml in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einem Einfriergefäß platziert und über Nacht zunächst bei -80 °C aufbewahrt. Nach etwa 24 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt [189].

4.2.2.3 Auftauen humaner Zellen

Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und einmal mit Medium gewaschen, um das DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in geeigneter Menge Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt [189].

4.2.2.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Mithilfe der transienten Transfektion kann Fremd-DNA z. B. in Form von Plasmiden oder siRNA zeitweilig in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu die

Transfektionsreagenzien Lipofectamine® 2000 bzw. 3000 (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welche Lösungen aus kationischen Liposomen sind, die mit der DNA kompakte, stabile, positiv geladene Komplexe bilden, welche anschließend durch die negativ geladene Plasmamembran in die Zelle gelangen. Die Transfektionen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Spleißexperimente wurden HEK293T-Zellen in 6-Well-Platten mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen für 3 Stunden mit 30 μM ULK-Inhibitor MRT67307 behandelt. Die transiente Transfektion wurde mithilfe des TransIT-LT1-Reagenz (Mirus Bio) gemäß den Herstellerangaben und wie in [190] beschrieben, durchgeführt. Folgende Plasmide wurden transfiziert: SV SRSF2 (2X) SD1 $\Delta\text{vpuenv-GFP}$, SV SRSF2 (2X) -1G3U $\Delta\text{vpuenv-GFP}$ [2, 3]; pUCB Δ U1, pUCU1 6A [2] und pXGH5 (Normalisierung und Transfektionseffizienz). Nach 20 Stunden wurden die Zellen geerntet und eine RNA-Isolation durchgeführt.

4.2.2.5 Generierung stabiler *Knockdown*-Zelllinien

Die Generierung einer stabilen *Knockdown*-Zelllinie erfolgte mittels transients Transfektion von pRFP-C-RS-shRNA-Plasmiden und anschließender Selektion mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin nach Angaben des Herstellers („Generierung stabiler Zellen ohne retrovirale Infektion“, HuSH-29™ shRNA, OriGene).

4.2.3 Biochemische Methoden

4.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [193]

Um Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, bei der die Proben zunächst ein Sammelgel durchlaufen, das zur Aufkonzentrierung der Proteine dient, wodurch eine erhöhte Bandenschärfe erzielt wird. Anschließend werden die Proben innerhalb eines Trenngels aufgetrennt, welches je nach erwarteter Proteingröße unterschiedliche Prozentigkeit besitzen kann. Die durch SDS negativ geladenen Proteine wandern zur Anode, wobei kleinere Proteine schneller wandern als größere.

Nach Aufnahme der Proben in Probenpuffer wurden diese bei 94 °C für 5–10 Minuten erhitzt. Dies dient der Denaturierung der Proteine. Das im Probenpuffer enthaltene SDS löst die Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine auf und überdeckt deren Eigenladung mit einer konstant negativen Ladung. β -Mercaptoethanol, welches ebenfalls Bestandteil des Probenpuffers ist, spaltet Disulfidbrücken und unterstützt somit die Denaturierung. Nach Beladung der Gele erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 45 mA pro Minigel bzw. 800 V/h pro großem Gel [189].

4.2.3.1.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Mithilfe der Coomassie-Färbung können sämtliche Proteine auf SDS-Gelen sichtbar gemacht werden. Coomassie Brilliant Blau G-250 bindet vorwiegend basische und aromatische Aminosäurereste. Für die Färbung wurde das Gel für mindestens 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mithilfe von Coomassie-Entfärbelösung soweit entfärbt, bis einzelne Banden gut erkennbar waren [189].

4.2.3.1.2 Autoradiographie von Proteingelen

Zur Visualisierung radioaktiv markierter Proteine wurde das SDS-Gel im Anschluss an die Coomassie-Färbung auf Whatman®-Papier gelegt, mit Saran-Folie umwickelt und bei 80 °C im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde es in eine Filmkassette gelegt und gegebenenfalls zusätzlich mithilfe einer Verstärkerfolie (^{35}S , ^3H) gegen einen Mehrzweckfilm bei -80 °C exponiert [189].

4.2.3.2 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* BL21-Zellen

Um Bakterienzellen zur Expression rekombinanter Proteine zu nutzen, wurde zunächst das entsprechende Plasmid in *E. coli* BL21-Zellen transformiert und anschließend eine Kolonie von der Agarplatte in eine 100 ml Vorkultur (LB- oder SB-Medium) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde ein Teil der Vorkultur in 1 Liter SB-Medium, versetzt mit entsprechendem Selektionsantibiotikum, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Proteinexpression wurde dann mit 1 mM IPTG für 4–6 Stunden induziert. Dazu wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 180 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension bei 10.000 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem das Pellet in PBS resuspendiert und bei 4.800 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert wurde, erfolgte die Aufreinigung der Proteine.

4.2.3.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Um GST-Fusionsproteine aus *E. coli* BL21-Zellen aufzureinigen, wurden 25 ml Aufschlusspuffer auf das Pellet einer 1 Liter Bakteriensuspension gegeben. Der Puffer wurde zuvor mit entsprechender Menge Protease-Inhibitor versetzt. Die Bakteriensuspension wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert und zwischendurch gemischt. Nach Zugabe von 12,5 mg Lysozym erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 15–30 Minuten. Für die vollständige Zelllyse wurden die Bakterien mit Ultraschall behandelt. Dazu wurden die Bakterien 3x für 30 Sekunden in 5 Zyklen sonifiziert und zwischendurch auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 30.000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert, um das Lysat von Zelltrümmern und Nukleinsäuren zu befreien. In der Zwischenzeit wurde 1 ml Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) zunächst in 25 ml ddH₂O und dann in 25 ml Aufschlusspuffer bei 2.000 g und 4 °C für 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde das Lysat zur Sepharose gegeben und mindestens für 1,5 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert, um eine Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose zu ermöglichen. Die Sepharose wurde daraufhin durch Zentrifugation bei 2.000 g und 4 °C für 5 Minuten 3x mit Aufschlusspuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Aufreinigung wurde hinsichtlich Reinheit und Ausbeute mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft [189].

4.2.3.4 Expression rekombinanter Proteine in Flp-In™ 293 T-REx™-Zellen

Die Proteinexpression in Flp-In™ 293 T-REx™-Zellen wurde soweit nicht anders angegeben mit 0,1 µg/ml Doxycyclin für 16 Stunden induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert [189].

4.2.3.5 Herstellung von Totalzellextrakt aus humanen Zellen

Nachdem die Zellen geerntet und bei 1.200 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert wurden, erfolgte der Zellaufschluss zunächst durch Einfrieren des Pellets bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff und anschließender Zugabe von Lysepuffer (500 µl/20 Mio. Zellen), welcher vorher mit Protease-Inhibitor versetzt wurde. Nach 15-minütiger Lyse wurde die Zellsuspension bei 17.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mithilfe des Bradford-Tests bestimmt. Die Lysate wurden entweder sofort verwendet oder bei -80 °C gelagert [189].

4.2.3.6 Herstellung von Cytoplasma-Extrakt (S100)

Um aus eukaryotischen Zellen ausschließlich das Cytoplasma zu extrahieren, wurde das 3-fache Zellvolumen an Roeder A-Puffer (Niedrigsalzpuffer ohne Detergens) [194] auf das Zellpellet gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurde das Quellen der Zellen ermöglicht. Anschließend wurde die Zellsuspension 10x mithilfe eines Douncers homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 17.000 g und 4 °C für 30 Minuten wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf eine Endkonzentration von 150 mM NaCl eingestellt. Der Überstand wurde bei Bedarf filtriert und der Proteingehalt mithilfe des Bradford-Tests bestimmt. Die Extrakte wurden entweder sofort verwendet oder bei -80 °C gelagert [189].

4.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Proteinkonzentration eines Lysats oder Cytoplasma-Extraktes zu bestimmen, wurde der Bradford-Test durchgeführt. Diese sehr sensitive Methode beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blau G-250 mit Proteinen. Unter sauren Bedingungen liegt der Farbstoff kationisch vor und besitzt eine rote Farbe. Bindet der Farbstoff an Proteine, konvertiert er in eine stabile unprotonierte blaue Form, welche bei 595 nm photometrisch bestimmt werden kann. Coomassie Brilliant Blau G-

250 bindet vorwiegend basische und aromatische Aminosäurereste. Aus diesem Grunde ist die Farbreaktion von der Proteinzusammensetzung abhängig. Zur Konzentrationsbestimmung ist daher ein relativer Standard notwendig. In dieser Arbeit wurde dazu das Protein BSA verwendet.

Zunächst wurden je 10 µl des Standards in den Konzentrationen 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 und 400 µg/ml in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 10 µl der zu testenden Probe in geeigneter Verdünnung auf die Platte pipettiert. Sowohl die Messung des Standards als auch der Proben erfolgte je in einer Doppelbestimmung. Zuletzt wurden 200 µl Bradford-Lösung/Well zugegeben, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss wurde die OD₅₉₅ gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Standardkurve ermittelt [189].

4.2.3.8 Größenausschlusschromatographie/Gelfiltration

Mithilfe der Größenausschlusschromatographie wurden Cytoplasma-Extrakte fraktioniert und analysiert. Hierzu wurden eine *HiLoad 16/600 Superdex 200*- und eine *Superdex 200 Increase 10/300 GL*-Säule verwendet, welche eine Auftrennung von Proteinkomplexen im Bereich von 10 kDa bis 600 kDa erlauben. Nach Äquilibration der Säule wurde eine definierte Menge Cytoplasma-Extrakt auf die Säule übertragen und das Eluat in 2 ml- bzw. 500 µl-Fraktionen gesammelt. Im Anschluss wurden 32 µl/Fraktion (kleines Gel) bzw. 100 µl/Fraktion (großes Gel) mittels Western Blot-Analysen untersucht.

Die molekulare Größe der einzelnen Komplexe wurde mithilfe von Gelfiltrationsmarkern (Thyroglobulin, Ferritin, Aldolase, Albumin, Ovalbumin, RNase) unterschiedlicher, aber bekannter Größen bestimmt. Sie wurden unter identischen Bedingungen fraktioniert [189].

4.2.3.9 Gekoppelte *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen

Mithilfe des TNT® *Quick Coupled Transcription/Translation Systems* (Promega) wurden Proteine *in vitro*-transkribiert und -translatiert. Es enthält die komplette Translationsmaschinerie, wie Ribosomen, tRNA, Aminoacyl-tRNA-Synthetase, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren.

Ein üblicher Ansatz betrug ~25 µl und bestand aus den folgenden Komponenten:

25,0 µl	TNT® T7 Quick Master Mix (Promega)
0,5–2 µg	Plasmid-DNA
15 µCi	L-[³⁵ S]Methionin

Der Ansatz wurde für 1,5–2 Stunden bei 30 °C und 350 rpm inkubiert und anschließend bei –20 °C eingefroren. Zur Überprüfung der Translation wurden 1,5 µl abgenommen und eine SDS-PAGE und Coomassie-Färbung durchgeführt. Anschließend wurde ein Film aufgelegt [189].

4.2.3.10 *In vitro*-Protein-Protein-Bindungsstudien

Um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wurden zum einen ein radioaktives Interaktionsexperiment und zum anderen ein so genannter Pulldown durchgeführt.

Im Rahmen des radioaktiven Interaktionsexperiments wurden die potenziellen Interaktionspartner in Interaktionspuffer bei 4 °C für 90 Minuten rotierend inkubiert. Dabei lag ein Interaktionspartner als *in vitro*-Translat und der andere als Fusionsprotein an Agarose gebunden vor. Anschließend erfolgte je zweimaliges Waschen mit Interaktionspuffer gefolgt von Zentrifugation bei 3.800 g und 4 °C für 5 Minuten. Zuletzt wurden die Proteine durch Zugabe von Probenpuffer von den Agarose-Beads eluiert und es wurde eine SDS-PAGE und Coomassie-Färbung durchgeführt. Die Analyse der Interaktion erfolgte mittels Autoradiographie.

Mithilfe der Pulldown-Methode können für ein Ziel-Protein potenzielle Interaktionspartner ermittelt werden. Hierzu wurden zum Ziel-Fusionsprotein, welches gebunden an eine Matrix vorlag, mögliche Interaktionspartner in Form von Zelllysaten oder S100-Extrakten gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C rotierend, erfolgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer durch Zentrifugation bei 3.800 g und 4 °C für 10 Minuten. Dadurch wurden ungebundene Proteine entfernt. Zuletzt wurden die Proteine durch Zugabe von Probenpuffer von den Agarose-Beads eluiert und die potenzielle Interaktion mithilfe von Western Blot analysiert [189].

4.2.3.10.1 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Die Dissoziationskonstante (K_d) von pICln wt und der entsprechenden Aspartatmutante für SmB und SmG wurde mittels SPR ermittelt. Die Immobilisierung der Liganden wurde unter leicht sauren Bedingungen durch Verdünnen der Proteinlösung (in 50 mM Hepes, 150 mM NaCl und 1 mM EDTA, pH 7,0) in 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,0 und Injektion auf einen N-Hydroxysuccinimid (NHS) / 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)-aktivierten Serie S CM5 Sensorchip durchgeführt.

Durch sequenzielle Injektion des Liganden wurde das Immobilisierungslevel von 100 RU für SmB (25 kDa) und 400 RU für GST-pICln (51 kDa) erreicht. Die Blockierung sowohl der restlichen aktivierten Oberfläche der Liganden-Flusszelle als auch der aktivierten Referenz-Flusszelle wurde durch Injektion

von 1 M Ethanolamin pH 8,5 für 7 Minuten erreicht. Die Analyten wurden in 2x Probenpuffer (2 mg/ml BSA, 2 mM DTT und 0,02 % Igepal) verdünnt und die Affinitätsmessungen erfolgten in Laufpuffer. Während der Messung wurden die Analyten bis zur Injektion gegen Verdunstung geschützt und bei 10 °C gelagert. Für die Affinitätsbestimmung der Analyten wurden kinetische Multizyklus-Experimente bei 20 °C und einer Flussrate von 10 µl/Minute durchgeführt. Zwischen jedem Zyklus erfolgte eine Regenerationsphase (200-sekündige Injektion von 10 mM Glycin pH 10 bei 30 µl/Minute, gefolgt von einer Stabilisierungsperiode von 500 Sekunden mit Laufpuffer), wenn die Zeit der Dissoziationsphase nicht ausreichte um gebildete Komplexe zwischen Ligand und Analyt aufzulösen. Für die Dauer der Assoziations- und Dissoziationsphase wurden für SmB – pICln 600–1000 Sekunden und für GST-pICln – SmG 100–600 Sekunden gewählt. Die Referenz-Flusszelle und die Pufferzyklen wurden als Referenz für die Sensorgramme verwendet. Zur Auswertung wurden die Sensorgramme mittels des *Steady-State-Fit*-Modells (Biacore T200 Evaluation Software 2.0, GE Healthcare) angepasst, während der *Offset* konstant auf 0 gesetzt wurde.

4.2.3.11 *In vitro*-Methylierungsexperimente

Um die Methylierung zwischen einer Methyltransferase und seinem potenziellen Substrat zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Methylierungsexperiment durchgeführt. Dazu wurde eine geeignete Menge des potenziellen Substrats, welches zuvor affinitätschromatographisch aufgereinigt wurde, mit 105 ng der Methyltransferase, 2 µl 10x Methylierungspuffer und 2 µCi Adenosyl-L-Methionin, S-[Methyl-³H] auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1 Stunde bei 450 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Autoradiographie analysiert [189].

4.2.3.12 *In vitro*-Phosphorylierungsexperimente

Mithilfe von *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten wurden potenzielle Substrate unterschiedlicher Kinasen untersucht. Es wurden zunächst zwei Ansätze mit den folgenden Komponenten vorbereitet: Ansatz A enthielt das potenzielle Substrat in geeigneter Menge sowie 2 µM ATP, Ansatz B enthielt die Kinase in geeigneter Menge sowie 1 µl Puffer A + 75 mM Magnesiumacetat. Beide Ansätze wurden mit ddH₂O auf 10 µl (Ansatz A) bzw. 9 µl (Ansatz B) Gesamtvolumen aufgefüllt. Daraufhin wurde Ansatz A in Ansatz B überführt, 10 µCi [γ-³²P]-ATP zugegeben und der Gesamtansatz bei 30 °C und 450 rpm für 30–45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Autoradiographie analysiert.

Zur Untersuchung von Zellextrakten und Fraktionen der Gelfiltration wurden 25 µl Fraktion bzw. 100 µg Extrakt mit 25 µl bzw. entsprechender Menge Kinase-Puffer, einer geeigneten Menge an potenziellem Substrat und 10 µCi [γ - 32 P]-ATP versetzt und für 45 Minuten bei 30 °C und 450 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben dreimal mit Kinase-Waschpuffer gewaschen, in Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Autoradiographie analysiert [189].

4.2.3.13 Massenspektrometrische Analysen

Zur Analyse der Phosphorylierungsstellen in pICln wurden die entsprechenden Proben im Anschluss an die *in vitro*-Phosphorylierung mittels SDS-PAGE separiert, entsprechende Gelstücke ausgeschnitten und ein In-Gel-Verdau durchgeführt. Die NanoLC-MS/MS Analyse wurde mit einem Hybrid Dual-Pressure Linear Ion Trap/Orbitrap Massenspektrometer, ausgestattet mit einer U3000 Nano-Flow HPLC, wie in [195] beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden die Proben über eine 75 µm I.D., 25 cm PepMap C18-Säule mit 300 nl/min für 95 Minuten aufgetrennt unter Anwendung eines Gradienten von 2 % ACN bis 35 % ACN in 0,1 % Ameisensäure. Für die Akquirierung der MS/MS-Spektren wurde ausschließlich kollisionsinduzierte Dissoziation mit Breitbandaktivierung (Pseudo MS3 für neutralen Verlust von Phosphatresten) durchgeführt.

Die Erfassung der Spektren erfolgte mittels Orbitrap Full MS Scan (FTMS; Auflösung 60.000; m/z-Verhältnis 400–2000) gefolgt von bis zu 15 LTQ MS/MS-Experimenten (Linear Trap; Minimum Signal-Threshold: 500; Breitbandisolierung; dynamische Zeitausschlusseinstellung: 30 s; einfachgeladene Ionen wurden von der Selektion ausgeschlossen, normalisierte Kollisionsenergie: 35 %; Aktivierungszeit: 10 ms). Die Verarbeitung der Rohdaten, Proteinidentifizierung und die Zuordnung der Phosphopeptide wurden mit PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions) durchgeführt. Die *False Discovery Rate* (FDR) wurde auf < 1 % festgelegt. Phosphorylierungsstellen mit einer posterioren Fehlerwahrscheinlichkeit von < 0,005 (modifizierter T-Test, PEAKS Studio 7.0) und einem PhosphoRS-Score > 90 % wurden als sicher eingestuft.

Zur Analyse der pICln-Komplexe wurden 5 µg GST-pICln wt und Phosphomutanten mit 1 mg HEK293T-S100-Extrakt über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) und weiterer Inkubation bei 4 °C für 4 Stunden wurden die aufgereinigten Proteine dreimal mit Waschpuffer und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine *on beads digestion*, wie in [196] beschrieben, durchgeführt. In Kürze: GST-pICln, gebunden an GSH-Sepharose, wurde in 50 mM Ammoniumbicarbonat resuspendiert, die Cysteine mit 2 mM Dithiothreitol (DTT) reduziert und für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit 10 mM

Methylmethanthiosulfonat (MMTS) behandelt. Der Verdau erfolgte mit 0,5 µg Trypsin (Promega) bei 37 °C über Nacht. Die Peptide wurden durch Vereinigung des ersten Überstandes und des folgenden Waschschriffs durch 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) gewonnen. Anschließend wurden die Peptide mit einer *Reversed phase C18 ZipTip*-Nanosäule (Millipore) aufgereinigt, mit 0,1 % TFA/70 % ACN eluiert und getrocknet. Die Identifizierung der Proteine wurde mithilfe eines hochauflösenden Hybrid Dual-Pressure Linear Ion Trap/Orbitrap Massenspektrometers wie oben beschrieben durchgeführt. Die relative Proteinquantifizierung erfolgte mithilfe der Skyline-Analyse-Plattform [197].

4.2.4 Immunologische und immunbiochemische Methoden

4.2.4.1 Western Blot [198]

Zur Proteindetektion müssen die aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen werden. Mithilfe der Wet-Blotting Apparatur wird dies ermöglicht. Durch ein senkrecht gerichtetes elektrisches Feld wandern die Proteine aus dem Gel auf die Membran. Nun können diese mittels Antikörper detektiert werden.

Für das Blotten wurden in die Gelkassette ein Schaumkissen und zwei mit Wet-Transfer-Puffer befeuchtete Whatman® Filterpapiere in Richtung der Kathode gelegt, darauf das Gel, die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran, ein weiteres Whatman® Filterpapier und ein weiteres Schaumkissen. Die Gelkassette wurde in den Puffertank überführt und dieser mit Wet-Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei 550 mA für 1,5 Stunden (großer Blot) bzw. bei 105 V für 1–1,5 Stunden (kleiner Blot). Im Anschluss wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % (v/v) Milchpulver inkubiert, um die freien unspezifischen Proteinbindstellen der Membran zu blockieren. Nach Waschen der Membran in TBS-T erfolgte die Behandlung mit Primärantikörper in geeigneter Verdünnung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde in TBS-T gelöst und mit 0,05 % Natriumazid versetzt. Nach Waschen der Membran erfolgte die Inkubation mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper nach den Angaben des Herstellers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran dreimal für 20 Minuten in TBS-T gewaschen und mithilfe des Odyssey® Infrared Imaging Systems analysiert [189].

4.2.4.2 Immunpräzipitation (IP)

Mithilfe der (Co-)Immunpräzipitation kann mittels eines Antikörpers, welcher an Protein A- bzw. G-Agarose gebunden ist, spezifisch ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysate mit all seinen Interaktionspartnern isoliert werden. Alternativ können bereits an Agarose gebundene Antikörper (GFP-Trap®_A) verwendet werden. Dazu wurde 5 µl Agarose einmal in Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 mg Zelllysate bzw. S100-Extrakt zugegeben und zur Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes mindestens 1,5 Stunden oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer durch Zentrifugation bei 3.800 g und 4 °C für 5 Minuten wurden die Proteine durch Zugabe von Probenpuffer von den Agarose-Beads eluiert und das Eluat mithilfe von Western Blot analysiert.

4.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung (IF)

Zur Untersuchung der Motoneurone in Zebrafisch-Embryos wurden diese zunächst in 4 % Paraformaldehyd/PBS über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für 5 Minuten erfolgte schrittweise eine Aufnahme in Methanol, indem die Larven für jeweils 5 Minuten mit den folgenden Methanol/PBS-Konzentrationen gewaschen wurden: 30 %, 2x 50 %, 70 %, 90 % und 2x 100 %. Zur Permeabilisierung des Gewebes wurden die Larven für mindestens 30 Minuten bei -20 °C in 100 % Methanol inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur gebracht und schrittweise zurück in PBS geführt (70 %, 2x 50 %, 30 % Methanol/PBS, PBS pur). Nach zweimaligem Waschen in PBT für 10 Minuten erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen in 10 % FCS/PBT für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Embryos wurden mit dem Motoneuron-spezifischen Primärantikörper *znp-1* in 10 % FCS/PBT über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Embryos 20 Minuten in PBT gewaschen und für 3 Stunden mit Sekundärantikörper Alexa Fluor 647 in 10 % FCS/PBT bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 10 Minuten in PBT wurde der Dottersack der Embryos entfernt, letztere in Mowiol eingebettet und daraufhin mikroskopisch untersucht.

5 ERGEBNISSE

5.1 Der PRMT5-Komplex interagiert mit der Serin-Threonin-Kinase *Unc-51-like kinase 1* (ULK1)

Die Serin-Threonin-Kinase *Unc-51-like kinase 1* (ULK1) besitzt unter anderem eine entscheidende Rolle in der Autophagie, da sie als Antwort auf Nährstoffmangel diesen Recycling-Mechanismus induziert [199]. Im Rahmen vorangegangener massenspektrometrischer Interaktionsstudien unserer Arbeitsgruppe konnten neue Interaktionspartner von ULK1 identifiziert werden. Darunter befand sich der PRMT5-Komplex, bestehend aus der Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5), dem Methylosom-Protein 50 (WD45/MEP50) und dem *chloride conductance regulatory protein* pICln [123]. Der auch als Methylosom bezeichnete PRMT5-Komplex spielt eine wichtige Rolle in der Biogenese der *uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins* (U-snrNPs), welche die Hauptbestandteile des Spleißosoms sind [49].

Um die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse zu verifizieren, wurde eine Immunpräzipitation aus Cytoplasma-Extrakten (S100) von Flp-InTM T-RexTM 293-Zellen durchgeführt, die induzierbar GFP bzw. GFP-ULK1 überexprimieren. Im Vergleich zur GFP-Kontrolle wurden mit GFP-ULK1 die Komponenten des PRMT5-Komplexes PRMT5, WD45 und pICln co-präzipitiert. Um den Einfluss der Autophagie auf die Interaktion zu untersuchen, wurden die Zellen eine Stunde mit dem Mangelmedium EBSS kultiviert und anschließend eine Immunpräzipitation durchgeführt. EBSS sorgt durch Nährstoffmangel für die Induktion von Autophagie. Die PRMT5-Komplex-Komponenten wurden mittels GFP-ULK1 aus Zellextrakten von EBSS-behandelten und unbehandelten Zellen in gleichem Maße co-präzipitiert. Die Interaktion zwischen ULK1 und dem PRMT5-Komplex scheint also unabhängig von der Autophagie zu erfolgen (Abbildung 10 a).

Die Bildung des Autophagie-induzierenden Komplexes bestehend aus ULK1, ATG13, ATG101 und FIP200 [114, 199] ist von der C-terminalen Domäne (CTD) von ULK1 abhängig [118]. Um zu überprüfen, ob die Bindung des PRMT5-Komplexes an ULK1 ebenfalls über dessen C-terminale Domäne reguliert wird, wurde eine Immunpräzipitation aus S100-Extrakten von Flp-InTM T-RexTM 293-Zellen durchgeführt, die neben GFP bzw. GFP-ULK1 eine trunkierte Form von ULK1 ohne CTD (ULK1/ Δ CTD) induzierbar überexprimieren. Sowohl die wildtypische als auch die trunkierte Form von ULK1 co-präzipitierten die PRMT5-Komplex-Komponenten gleichermaßen. Wie erwartet wurden hingegen FIP200, ATG13 und ATG101 mit der trunkierten Form nicht bzw. in geringerer Menge co-präzipitiert (Abbildung 10 b). Die Interaktion von ULK1 mit dem PRMT5-Komplex erfolgt folglich unabhängig von der C-terminalen Domäne von ULK1.

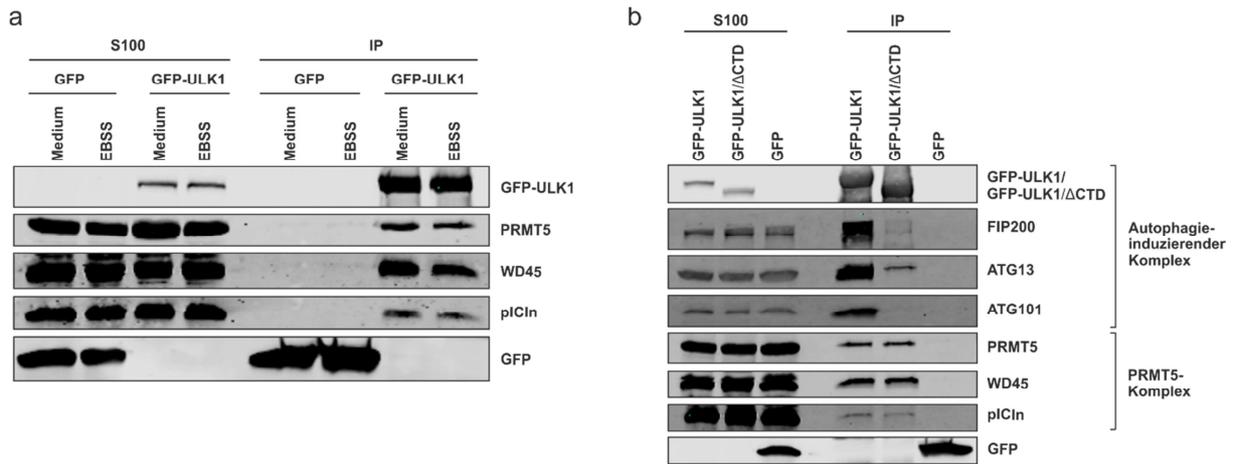


Abbildung 10: ULK1 interagiert mit dem PRMT5-Komplex unabhängig von EBSS-induzierter Autophagie und von seinem C-Terminus. **a**, Flp-InTM T-RexTM 293-GFP-ULK1- und Flp-InTM T-RexTM 293-GFP-Zellen wurden mit 0,1 µg/ml Doxycyclin für 18 Std. stimuliert und für 1 Stunde mit EBSS behandelt. Nach Cytoplasma-Extraktion (S100) erfolgte eine GFP-Immunpräzipitation und eine Analyse durch Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörper gegen GFP, PRMT5, WD45 und p1Cln. **b**, Flp-InTM T-RexTM 293-GFP-ULK1-, Flp-InTM T-RexTM 293-GFP-ULK1/ΔCTD- und Flp-InTM T-RexTM 293-GFP-Zellen wurden mit 0,1 µg/ml Doxycyclin für 18 Stunden induziert. Nach Cytoplasma-Extraktion (S100) erfolgte eine GFP-Immunpräzipitation und eine Analyse durch Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörper gegen GFP, FIP200, ATG13, ATG101, PRMT5, WD45 und p1Cln.

Neben dem Autophagie-induzierenden Komplex, der eine Größe von ca. 2 MDa aufweist [113, 200], ist ULK1 zudem Teil eines Komplexes zwischen 400 und 500 kDa [118]. Da der PRMT5-Komplex ebenfalls in einem Bereich zwischen 400 und 600 kDa co-migriert [64, 69], wurde eine Größenausschlusschromatographie mithilfe einer *HiLoad 16/600 Superdex 200*-Säule durchgeführt, welche einen Auftrennungsbereich von 10 bis 600 kDa aufweist. Dazu wurde aus HEK293T-Zellen Cytoplasma-Extrakt präpariert und im Anschluss an die Gelfiltration zur Analyse der Komplexauftrennung ein Western Blot durchgeführt. ULK1 co-sedimentierte im Bereich zwischen 400 und 600 kDa zusammen mit PRMT5, WD45 und p1Cln (Abbildung 11). WD45 bildete einen weiteren Subkomplex, welcher zwischen 40 und 70 kDa migrierte. Das Protein p1Cln hingegen sedimentierte im gesamten Auftrennungsbereich zwischen 40 und 600 kDa mit Hauptfraktionen zwischen 70 und 150 kDa (Abbildung 11), welche den 6S-Komplex repräsentieren [69]. Dies bekräftigte die Ergebnisse der Immunpräzipitationen auf endogenem Level und zeigte, dass ULK1 neben dem Autophagie-induzierenden Komplex einen weiteren Komplex im Größenbereich zwischen 400 und 600 kDa mit dem Methylosom bildet.

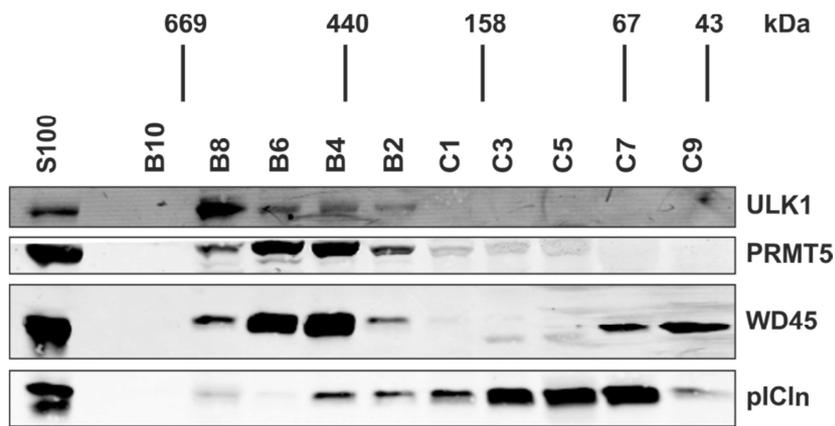


Abbildung 11: ULK1 interagiert mit dem PRMT5-Komplex *in vivo*. Cytoplasma-Extrakt (S100) wurde aus HEK293T-Zellen generiert und auf eine *HiLoad 16/600 Superdex 200*-Säule überführt. Die Fraktionen B10–C9 wurden mittels Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blots hinsichtlich der Auftrennung von ULK1, PRMT5, WD45 und pICln analysiert.

5.2 ULK1, ULK2 und ULK3 phosphorylieren pICln *in vitro*

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse ließen die Frage aufkommen, ob ULK1 ein neues Substrat der Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5) ist. Im Rahmen meiner Masterarbeit konnte mittels verschiedener *in vitro*-Methylierungsexperimente gezeigt werden, dass ULK1 von PRMT5 nicht methyliert wird [189]. Da ULK1 eine Serin-Threonin-Kinase ist und die U-snRNP-Biogenese durch Phosphorylierungen reguliert wird [81], wurden andererseits die einzelnen Bestandteile des Methylosoms als potenzielles Substrat von ULK1 getestet. In *in vitro*-Phosphorylierungsstudien mit wildtypischem ULK1 und einer katalytisch inaktiven Form von ULK1 konnte die Methylosom-Komponente pICln als neues Phospho-Substrat von ULK1 identifiziert werden. PRMT5 und WD45 hingegen wurden nicht von ULK1 phosphoryliert [189].

ULK2, ULK3, ULK4 und STK36 sind neben ULK1 weitere Mitglieder der ULK-Familie. Da ULK2 und ULK3 im Gegensatz zu ULK4 und STK36 gemäß Alignment mittels *EMBOSS Needle* [201] sowohl in der Gesamtsequenz (52,1 % bzw. 25,6 %) als auch in der Kinase-Domäne (78,7 % bzw. 41 %) zu ULK1 relativ homolog sind (Tabelle 1), wurden diese beiden Serin-Threonin-Kinasen neben ULK1 ebenfalls in einem Phosphorylierungsexperiment mit pICln untersucht.

Tabelle 1: Vergleich der ULK1-Sequenz mit den Sequenzen von ULK2, ULK3, ULK4 und STK36 hinsichtlich der Protein-Gesamtlänge und der Kinase-Domäne. Alignments mithilfe *EMBOSS Needle* durchgeführt [201].

	ULK1-Volllänge [%]	ULK1-Kinase-Domäne [%]
ULK2	52,1	78,7
ULK3	25,6	41,0
ULK4	12,0	30,9
STK36	14,0	36,1

Dazu wurde aktives ULK1, ULK2 oder ULK3 je als GST- bzw. His-Fusionsprotein aus Sf9-Insektenzellen mit GST-pICln bzw. GST aus *E. coli* und [γ - 32 P]-ATP für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend mittels Tris/Glycin-SDS-PAGE, Silberfärbung und Autoradiographie analysiert. Im Vergleich zu ULK1 wurde pICln durch ULK2 sehr schwach phosphoryliert (Abbildung 12 a, b). ULK3 hingegen phosphorylierte pICln in ähnlicher Intensität wie ULK1 (Abbildung 12 a, c). Alle drei Kinasen zeigten Autophosphorylierungsaktivität (Abbildung 12).

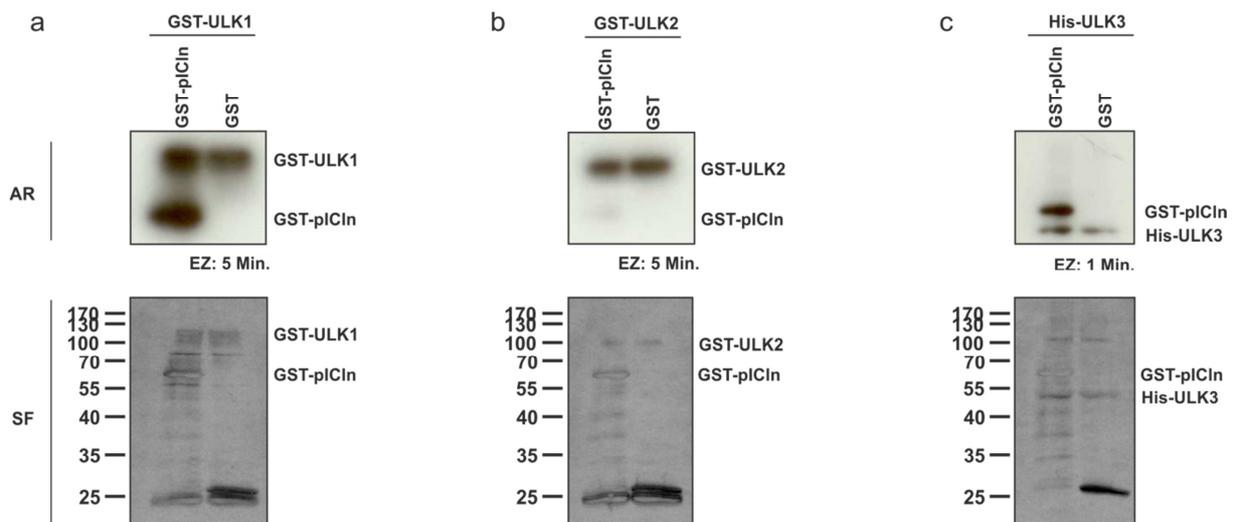


Abbildung 12: ULK1, ULK2 und ULK3 phosphorylieren pICln. Je 500 ng rekombinantes aktives GST-ULK1 (a), -ULK2 (b) bzw. His-ULK3 (c) aus Sf9-Zellen wurde in einem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit 500 ng GST-pICln oder GST (aufgereinigt aus *E. coli*) und 10 μ Ci [γ - 32 P]-ATP für 45 Min. bei 30 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE und Autoradiographie. AR: Autoradiographie, SF: Silberfärbung, EZ: Expositionszeit.

Da ULK3 in der zuvor beschriebenen Gelfiltration zum einen hauptsächlich als Monomer (53 kDa) vorliegt und nur in geringer Menge im Größenbereich von ca. 600 kDa sedimentiert und zudem nicht mit den Hauptfraktionen von PRMT5, WD45 und pICln co-migriert, komplexiert diese Kinase wahrscheinlich nicht mit dem Methylosom (Abbildung 13). Aus diesem Grunde wurde der Fokus der weiteren Arbeiten auf die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 gelegt.

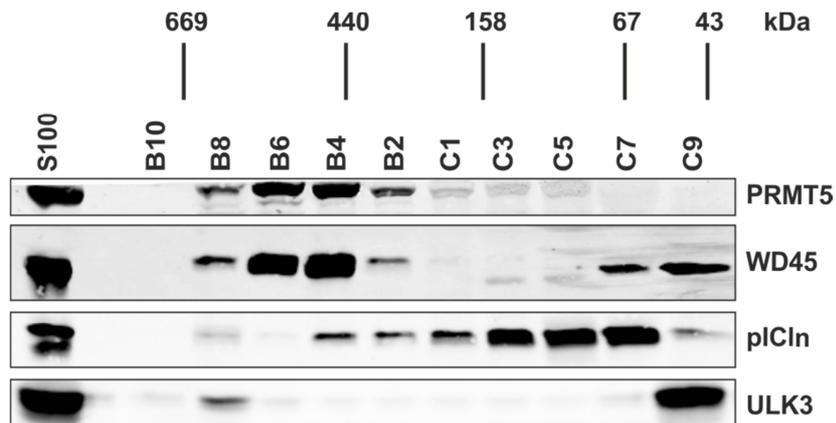


Abbildung 13: ULK3 interagiert nicht mit dem PRMT5-Komplex. Cytoplasma-Extrakt (S100) wurde aus HEK293T-Zellen generiert und auf eine *HiLoad 16/600 Superdex 200*-Säule überführt. Die Fraktionen B10–C9 wurden mittels Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blots hinsichtlich der Auftrennung von PRMT5, WD45, pICln (vgl. Abbildung 11) und zusätzlich ULK3 analysiert.

5.2.1 Charakterisierung der pICln-Phosphorylierung durch ULK1

Die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 wurde mittels verschiedener *in vitro*-Phosphorylierungsstudien näher charakterisiert. Um zunächst den Zeitpunkt der maximalen Phosphorylierung von pICln zu ermitteln, wurde das Substrat GST-pICln (aufgereinigt aus *E. coli*) mit Jurkat-Zelllysat für 0,5 bis 4 Stunden mit steigender $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Menge inkubiert, um eine ausreichende ATP-Menge zu gewährleisten. Als Negativkontrolle diente wildtypisches *E. coli*-Lysat. Die Autoradiographie zeigte eine zunehmende Phosphorylierung von pICln mit einem Maximum nach 3,5 Stunden und $40\ \mu\text{Ci}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Die Negativkontrolle bestätigte, dass pICln durch *E. coli*-Lysat nicht phosphoryliert wird (Abbildung 14 a). Darüber hinaus wurde in einem weiteren *in vitro*-Kinase-Experiment die pICln-Menge titriert. Dazu wurde aktives GST-ULK1 mit steigender His-pICln-Menge 45 Minuten bei $30\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Je höher die Menge an pICln war, desto höher war auch die Phosphorylierungsintensität. Ab $750\ \text{ng}$ pICln war die Phosphorylierungsstärke in der Autoradiographie nicht mehr unterscheidbar. Für ein distinktes Phosphorylierungssignal waren $250\ \text{ng}$ pICln optimal. Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit der ULK1-Autophosphorylierung von der pICln-Menge beobachtet werden. Je höher die Menge an pICln war, desto stärker war auch die

Autophosphorylierung von ULK1. Ab einer Menge von 750 ng pICln erreichte auch die Autophosphorylierungsaktivität von ULK1 ihr Maximum (Abbildung 14 b). Neben der maximalen pICln-Phosphorylierung wurde entsprechend die Dephosphorylierung titriert. Dazu wurde GST-pICln zunächst mittels Jurkat-Zelllysats maximal phosphoryliert (3,5 Stunden, 40 μ Ci [γ - 32 P]-ATP) und anschließend mithilfe der Lambda-Phosphatase bis zu 1 Stunde dephosphoryliert. Im Vergleich zur maximalen Phosphorylierung zum Zeitpunkt 0 konnte pICln durch die Lambda Phosphatase bereits nach 15 Minuten deutlich dephosphoryliert werden. Nach weiteren 15 Minuten lag pICln vollständig dephosphoryliert vor (Abbildung 14 c).

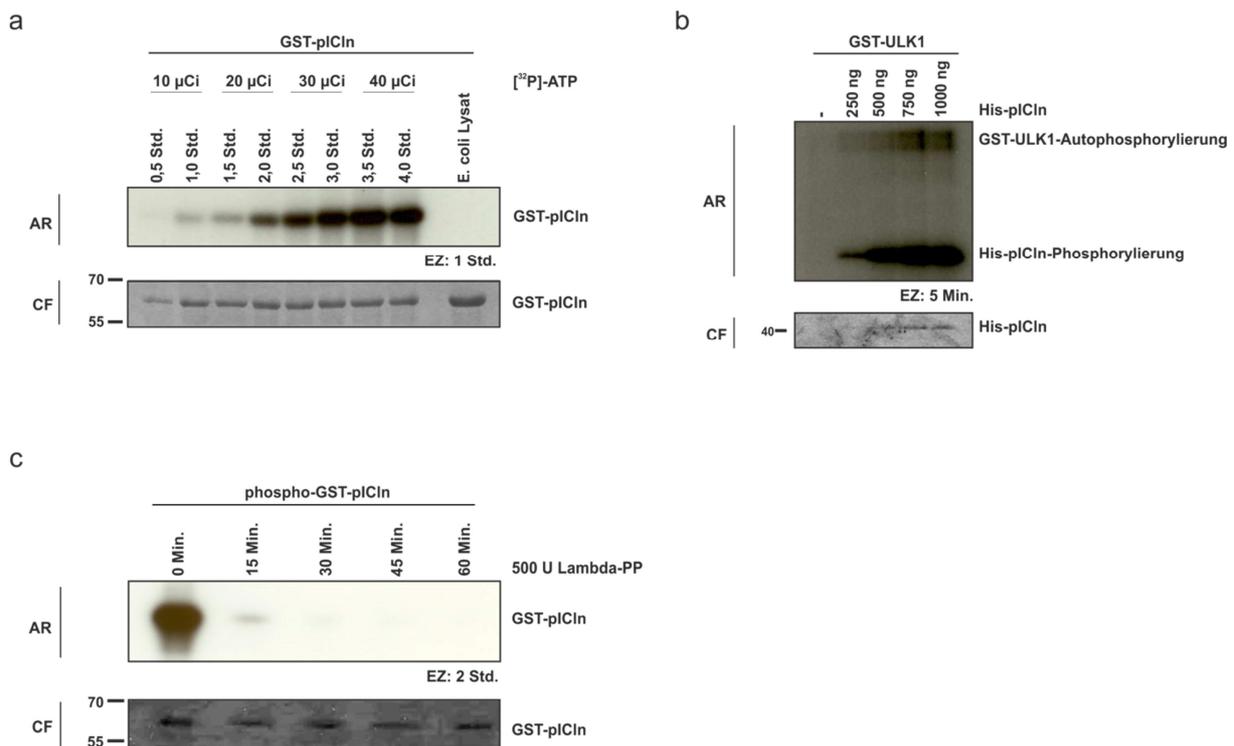


Abbildung 14: Charakterisierung der pICln-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung. **a**, 100 μ g Jurkat-Zelllysats wurde in einem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit einer entsprechenden Menge GST-pICln gebunden an GSH-Sepharose (aufgereinigt aus *E. coli*) für 0,5 bis 4 Stunden mit steigender [γ - 32 P]-ATP-Menge bei 30 °C inkubiert. Ein wildtypisches *E. coli*-Lysat diente als Negativkontrolle. Die Proben wurden anschließend mithilfe Tris-Glycin-SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. **b**, 250 ng rekombinantes aktives GST-ULK1 aus Sf9-Zellen wurde in einem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit steigender His-pICln-Menge (aufgereinigt aus *E. coli*) und 10 μ Ci [γ - 32 P]-ATP für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE und Autoradiographie. **c**, 100 μ g Jurkat-Zelllysats wurde in einem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit einer entsprechenden Menge GST-pICln gebunden an GSH-Sepharose (aufgereinigt aus *E. coli*) und 40 μ Ci [γ - 32 P]-ATP für 3,5 Stunden bei 30 °C maximal phosphoryliert. Nach fünfmaligem Waschen mit Interaktionspuffer erfolgte die Dephosphorylierung durch 500 U Lambda-Proteinphosphatase für 0 bis 60 Minuten bei 30 °C. Die Analyse erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE und Autoradiographie. AR: Autoradiographie, CF: Coomassie-Färbung, EZ: Expositionszeit.

5.3 Generierung eines ULK1-Knockdowns

Um den Einfluss der pICln-Phosphorylierung durch ULK1 genauer zu untersuchen, sollte eine stabile ULK1-Knockdown-Zelllinie generiert werden. Hierzu wurden entsprechende shRNA-Plasmide (pRFP-C-RS-ULK1 F1333957; -58; -59; -60, pRFP-C-RS-Kontroll-shRNA TR30015) in HEK293T-Zellen transfiziert und positive Klone mittels Puromycin selektiert. Diese wurden anschließend im Western Blot hinsichtlich der *Knockdown*-Effizienz überprüft. Die verschiedenen Klone zeigten eine Reduktion der ULK1-Expression zwischen 6 % und 82 % (Abbildung 15 a). Klone, deren ULK1-Restexpression zwischen 18 % und 32 % lag (Abbildung 15 a, mit Asterisk markiert), wurden im *in vitro*-Kinase-Experiment bezüglich der pICln-Phosphorylierung untersucht. Hierzu wurden die ausgewählten Zelllinien lysiert und die Lysate mit GST-pICln und [γ - 32 P]-ATP inkubiert. Die Klone 57 und 58+60.2 wiesen im Vergleich zu den anderen getesteten Klonen eine verringerte Fähigkeit zur Phosphorylierung von pICln auf (55 bzw. 81 % Restaktivität im Vergleich zur Kontrolle) (Abbildung 15 b, mit Asterisk markiert).

Im Rahmen nachfolgender Experimente (Immunpräzipitationen, Gelfiltrationen) konnte kein Einfluss dieser beiden ULK1-Knockdown-Zelllinien (57 und 58+60.2) auf die getesteten Bedingungen (z. B. Komplexzusammensetzungen) nachgewiesen werden. Aufgrund dessen und da die ULK1-Expression im Verlaufe der Experimente in den Zellen wieder zunahm, sprich der ULK1-Knockdown nicht stabil zu sein schien, wurden beide Klone nochmals hinsichtlich der *Knockdown*-Effizienz überprüft. Von beiden Klonen wurden in den Passagen 5 bis 8 Proben genommen, die Zellen lysiert und ein Western Blot durchgeführt. Klon 57 zeigte in Passage 5 noch eine ULK1-Expression von 50 %, Klon 58+60.2 von 23 %. Ab Passage 6 hingegen wiesen beide Klone eine vergleichbare ULK1-Expression zur Wildtyp-/Kontrollzelllinie auf (Abbildung 15 c). Mithilfe der quantitativen Real-Time PCR erfolgte zudem eine Analyse des mRNA-Levels der beiden Klone in Passage 12. Dazu wurden drei verschiedene Primer gegen ULK1 generiert, die zu unterschiedlichen Bereichen der mRNA komplementär sind. Das ULK1-mRNA-Expressionslevel von Klon 57 unterschied sich unabhängig vom Primer nicht wesentlich von der Kontrollzelllinie. Der Klon 58+60.2 zeigte unter Verwendung der verschiedenen Primer sogar ein erhöhtes ULK1-mRNA-Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15 d).

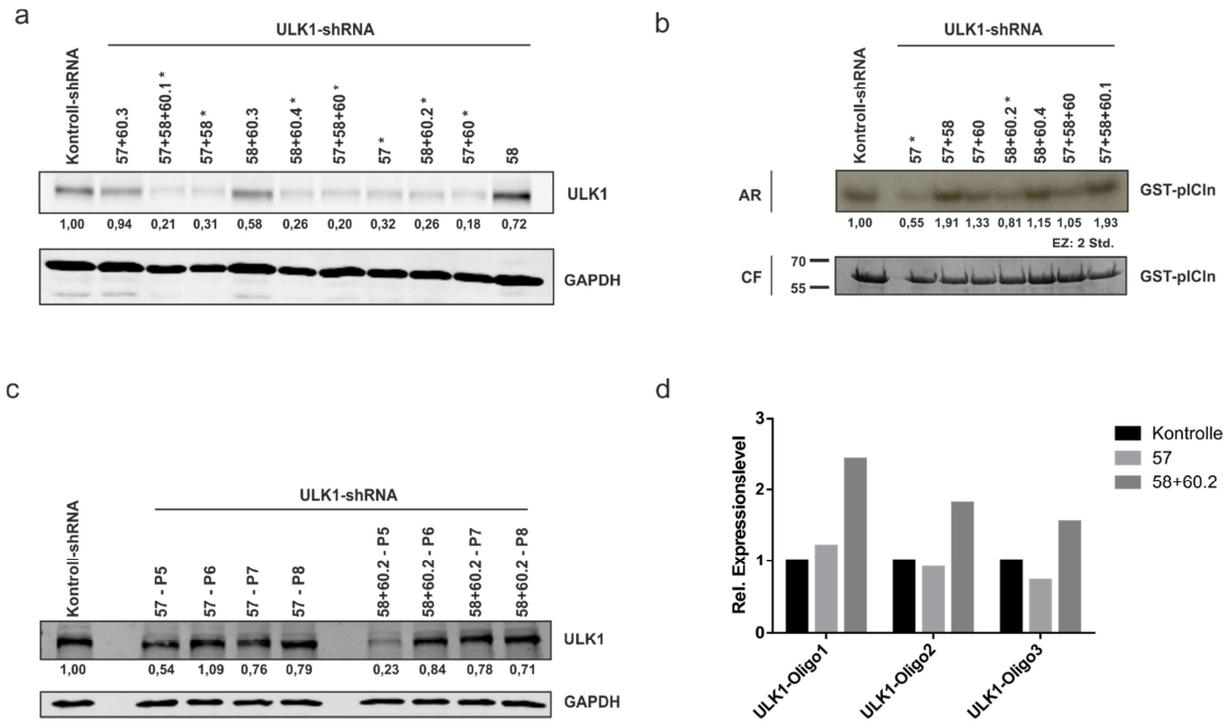


Abbildung 15: Generierung eines stabilen ULK1-Knockdowns in HEK293T-Zellen. **a**, HEK293T-Zellen wurden mit den shRNA-Plasmiden pRFP-C-RS-ULK1 F1333957; -58; -59; -60 und pRFP-C-RS-Kontroll-shRNA TR30015 transfiziert und positive Klone mittels Puromycin selektiert. Nach Zelllyse wurde die *Knockdown*-Effizienz im Vergleich zur Kontroll-shRNA mittels Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blots quantifiziert. *Klone mit ULK1-Restexpression zwischen 18 % und 32 %. AR: Autoradiographie, CF: Coomassie-Färbung. **b**, Mit je 100 µg der in (a) ausgewählten Klone wurde ein *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit einer entsprechenden Menge GST-pICln gebunden an GSH-Sepharose (aufgereinigt aus *E. coli*) für 30 Minuten und 10 µCi [γ - 32 P]-ATP bei 30 °C durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mithilfe Tris-Glycin-SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. *Klone mit 55 bzw. 81 % Restaktivität, EZ: Expositionszeit. **c**, Erneuter Test der Zelllinien 57 und 58+60.2 in den Passagen 5–8 mittels Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blots und Quantifizierung hinsichtlich der ULK1-Expression. **d**, Test des ULK1-Expressionslevels der HEK-ULK1-*Knockdown*-Zelllinien 57 und 58+60.2 in Passage 12 mittels qPCR unter Verwendung drei verschiedener Oligonukleotide.

Der ULK1-*Knockdown* blieb in den Zelllinien trotz Erhaltung der Selektionsbedingungen mit zunehmender Kultivierungsdauer nicht stabil. Möglicherweise hat eine Anpassung durch Entwicklung von Mechanismen stattgefunden, welche die Wirkung der shRNA inhibieren oder umgehen. Aus diesem Grunde wurde der ULK1-*Knockdown* transient mithilfe von siRNA erzeugt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit 25 bzw. 50 nM ULK1-siRNA transfiziert, diese jeweils nach 48 bzw. 72 Stunden geerntet und anschließend mittels Western Blots hinsichtlich der *Knockdown*-Effizienz überprüft. 25 nM eingesetzte siRNA zeigten sowohl 48 als auch 72 Stunden nach der Transfektion im Vergleich zur 0 Stunden-Kontrolle und unabhängig von der ausgesäten Zellzahl keinen expressionsreduzierenden Effekt. Die doppelte Menge an siRNA (50 nM) hingegen führte zu einer deutlichen Reduktion der ULK1-Expression. Zellen, die mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5/6$ -Well ausgesät wurden, wiesen bereits nach 48 Stunden keine ULK1-Expression mehr auf. Zellen in doppelter Dichte ($5 \times 10^5/6$ -Well) zeigten nach 48 Stunden noch 33 % und nach 72 Stunden nur noch 14 % ULK1-

Expression (Abbildung 16 a).

Um den Einfluss des ULK1-*Knockdowns* auf die Komplexzusammensetzung bzw. Interaktion mit dem PRMT5-Komplex zu untersuchen, wurde eine Größenausschlusschromatographie mit HEK293T-ULK1-*Knockdown*-Zellen durchgeführt. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit 50 nM ULK1-siRNA transfiziert, nach 48 Stunden geerntet, lysiert und das S100-Extrakt auf eine *HiLoad 16/600 Superdex 200*-Säule überführt. Mithilfe des Western Blots wurden die aufgetrennten Fraktionen im Hinblick auf die Verteilung der Methylosom-Komponenten PRMT5, WD45 und pICln untersucht. Im Vergleich zu wildtypischen HEK293T-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 16 b, vgl. Abbildung 11). ULK1 hat folglich keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des PRMT5-Komplexes.

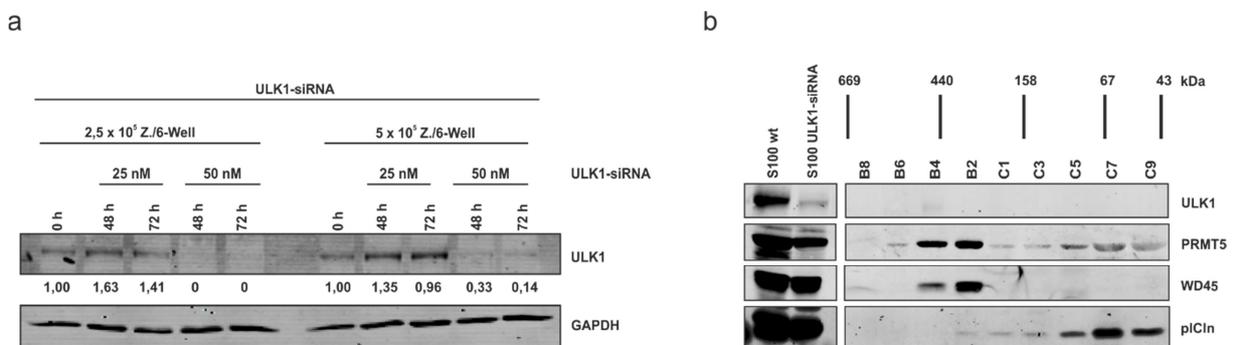


Abbildung 16: Ein ULK1-*Knockdown* hat keinen Einfluss auf die Methylosom-Zusammensetzung. a, 2,5 bzw. 5 x 10⁵ HEK293T-Zellen/6-Well wurden ausgesät und transient mit 25 bzw. 50 nM ULK1-siRNA transfiziert, nach 48 bzw. 72 Stunden geerntet und anschließend mittels Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blots hinsichtlich der *Knockdown*-Effizienz überprüft. b, HEK293T-Zellen wurden mit 50 nM ULK1-siRNA transfiziert, nach 48 Stunden geerntet, lysiert und das S100-Extrakt auf eine *HiLoad 16/600 Superdex 200*-Säule überführt. Die Fraktionen wurden mittels Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blots hinsichtlich der Auftrennung von ULK1, PRMT5, WD45 und pICln analysiert.

5.4 ULK1 phosphoryliert pICln *in vivo*

Um die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 *in vivo* zu überprüfen, wurden die Fraktionen der Gelfiltration aus wildtypischen HEK293T-Zellen (vgl. Abbildung 11) in einem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit GST-pICln und [γ -³²P]-ATP inkubiert. Die autoradiographische Analyse zeigte eine starke Phosphorylierung von pICln durch die ULK1-beihaltenden Fraktionen B6, B4 und B2 des Größenbereichs von ca. 400–600 kDa. Die stärkste Phosphorylierung erfolgte durch Fraktion B4 (Abbildung 17 a), welche den gesamten PRMT5-Komplex enthält (vgl. Abbildung 11). Die Fraktion B8 beinhaltete eine höhere ULK1-Menge als die Fraktionen B6–B2, zeigte aber keine Phosphorylierungsaktivität bezüglich pICln (Abbildung 17 a). Im Vergleich dazu wurde ein entsprechendes Phosphorylierungsexperiment mit Fraktionen der Gelfiltration aus HEK293T-ULK1-

Knockdown-Zellen durchgeführt (vgl. Abbildung 16 b). Insgesamt war die Phosphorylierung von pICln hier deutlich reduziert, vor allem in den Fraktionen B6, B4 und B2 (Abbildung 17 a, b). Der *Knockdown* von ULK1 führte demnach zu einer Reduktion der pICln-Phosphorylierung. Mit diesem Experiment konnte die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 *in vivo* gezeigt werden.

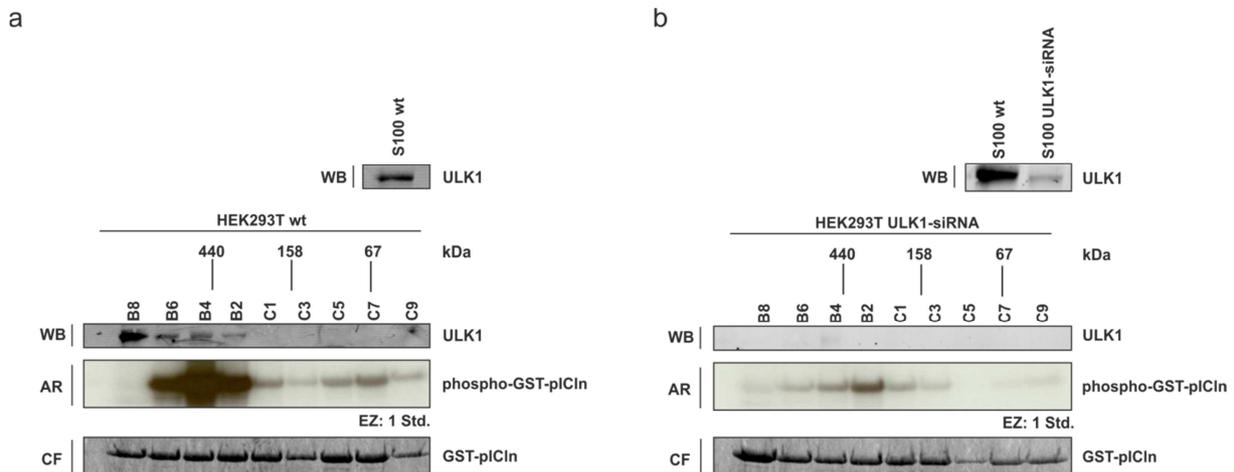


Abbildung 17: ULK1 phosphoryliert pICln *in vivo*. 20 μ l der Fraktionen B8–C9 der Gelfiltrationen aus wildtypischen HEK293T-Zellen (a) (vgl. Abbildung 11) und HEK293T-ULK1-*Knockdown*-Zellen (b) (vgl. Abbildung 16 b) wurden in einem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit einer entsprechenden Menge GST-pICln gebunden an GSH-Sepharose (aufgereinigt aus *E. coli*) und 10 μ Ci [γ - 32 P]-ATP für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE und Autoradiographie. WB: Western Blot, AR: Autoradiographie, CF: Coomassie-Färbung EZ: Expositionszeit.

5.5 Identifizierung der pICln-Phosphorylierungsstellen

Um die ULK-abhängigen Phosphorylierungsstellen in pICln zu identifizieren, wurde zunächst ein *in vitro*-Kinase-Experiment mit aktivem ULK1, ULK2 bzw. ULK3 und GST-pICln durchgeführt. Anschließend erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thilo Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) eine massenspektrometrische Analyse (NanoLC-MS/MS). Für die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 konnten die Serine 193, 195 und 197 als Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Für ULK2 wurden sowohl die Serine 193, 195 und 197 als auch 210 ermittelt (Tabelle 2). Die Phosphorylierungsstellen liegen für beide Kinasen demzufolge im C-terminalen Bereich von pICln zwischen den sauren Domäne 2 und 3 (Abbildung 18). ULK3 phosphorylierte pICln an den Serinen 102, 195, 197 und 210 (Tabelle 2). Zusätzlich zu den C-terminalen Serinen (S195, 197 und 210) befindet sich demzufolge eine weitere Position in der sauren Domäne 1 (S102) (Abbildung 18).

Tabelle 2: ULK1-, ULK2- und ULK3-abhängige Phosphorylierungsstellen in pICln. Phosphorylierungsstellen mit einem Score > 90 % (ausgewertet mit PhosphoRS) und einer posterioren Fehlerwahrscheinlichkeit (PFW) < 0,005 (modifizierter t-Test, PEAKS Studio 7.0) wurden als sicher eingestuft.

Kinase	Phosphorylierungsstelle	Score [%]	PFW
ULK1	S193	94,5	3,05E-05
	S195	100	2,30E-07
	S197	100	2,80E-06
ULK2	S193	99,4	1,70E-06
	S195	100	3,30E-07
	S197	95,4	5,70E-07
	S210	98,5	1,20E-05
ULK3	S102	100	1,04E-05
	S195	100	3,10E-07
	S197	100	4,40E-06
	S210	98,5	1,90E-05

5.6 Charakterisierung der ULK1-abhängigen Phosphorylierungsstellen in pICln

Nachdem die ULK1-abhängigen Phosphorylierungsstellen in pICln an den Positionen S193, 195 und 197 im C-Terminus lokalisiert wurden (Tabelle 2, Abbildung 18), erfolgte die Generierung einer phosphorylierungsinhibierenden Mutante, in der die drei Serine durch Alanine ausgetauscht wurden.

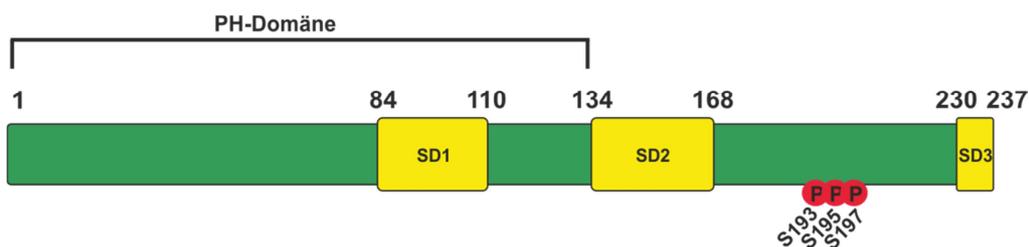


Abbildung 18: Schematische Darstellung von pICln inklusive der drei sauren Domänen (SD) und der ULK1-abhängigen Serin-Phosphorylierungsstellen an den Positionen 193, 195 und 197.

Anschließend wurden die Phosphorylierungsstellen mithilfe der Alanin-Mutante im *in vitro*-Kinase-Experiment mit aktivem ULK1 überprüft. Im Vergleich zu wildtypischem pICln wurde die Alanin-Mutante pICln S193, 195, 197A nicht von ULK1 phosphoryliert. Eine Inhibition von ULK1 durch den ULK1/2-Inhibitor MRT67307 [202] verhinderte vollständig die Phosphorylierung von pICln, sowohl von der wildtypischen Form als auch der Alanin-Mutante. Die Wirksamkeit des Inhibitors konnte anhand der Reduktion der ULK1-Autophosphorylierungsaktivität gezeigt werden (Abbildung 19). Mit diesem Experiment wurden die pICln-Phosphorylierungsstellen S193, 195 und 197 für ULK1 *in vitro* bestätigt.

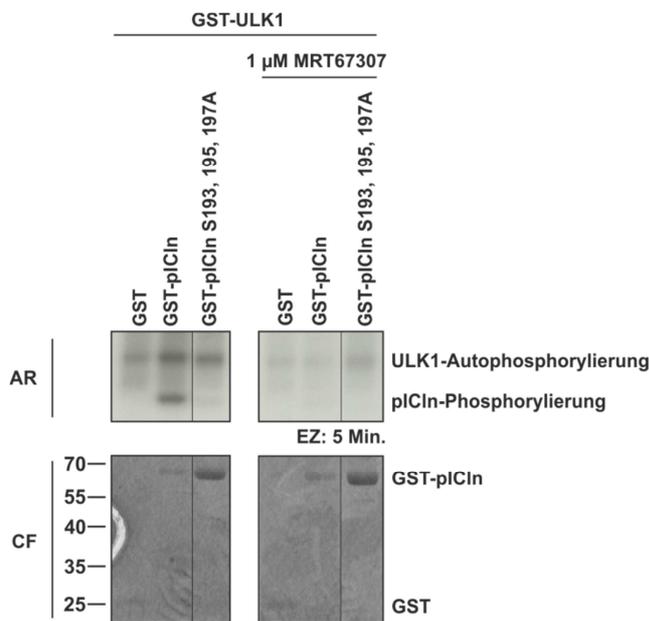


Abbildung 19: ULK1 phosphoryliert pICln im C-terminalen Bereich an den Serinen 193, 195 und 197. 250 ng rekombinantes aktives GST-ULK1 aus Sf9-Zellen wurde für 30 Minuten mit 1 µM ULK1/2-Inhibitor MRT67307 bei 30 °C behandelt. Mit Inhibitor behandeltes und unbehandeltes GST-ULK1 wurde anschließend in einem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit 500 ng GST-pICln (aufgereinigt aus *E. coli*) und 10 µCi [γ - 32 P]-ATP für 45 Min. bei 30 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE und Autoradiographie. AR: Autoradiographie, CF: Coomassie-Färbung, EZ: Expositionszeit.

5.6.1 Einfluss der ULK1-Phosphorylierung auf den PRMT5-Komplex

Neben der Alanin-Mutante wurde zudem eine phosphorylierungsimitierende Mutante kloniert, in der die drei Serine 193, 195 und 197 durch Aspartate ausgetauscht wurden. Um zu untersuchen, ob die pICln-Phosphorylierung durch ULK1 einen Einfluss auf die Komplexzusammensetzung des Methylosoms hat, wurden beide Phosphorylierungsmutanten sowie wildtypisches pICln in Form von GFP-Fusionsproteinen transient in HEK293T-Zellen transfiziert und anschließend wurde eine GFP-Immunpräzipitation aus Gesamtzelllysaten durchgeführt. Die wildtypische Form von pICln co-

präzipitierte PRMT5 und WD45. Sowohl mit der Alanin- als auch der Aspartat-Mutante wurden die Methylosom-Komponenten, verglichen mit dem wildtypischen Protein, in gleichem Maße co-präzipitiert (Abbildung 20). Die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 hat demnach keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Methylosoms.

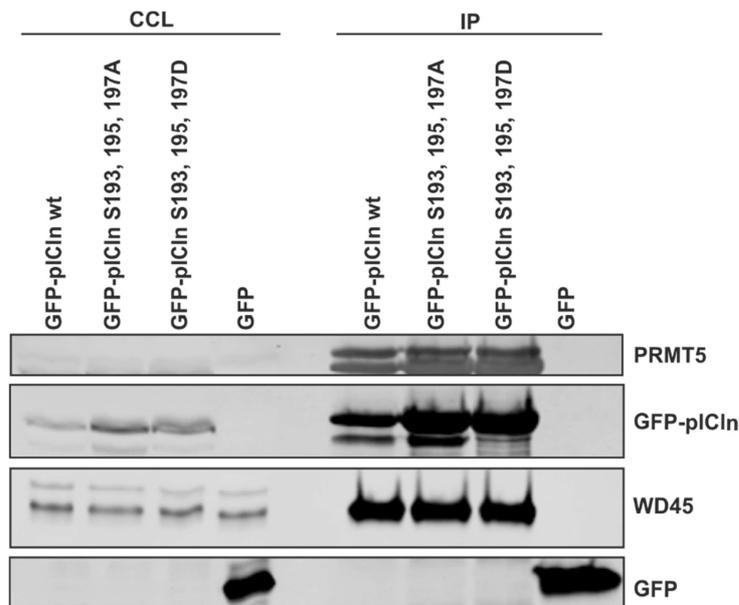


Abbildung 20: ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des PRMT5-Komplexes. HEK293T-Zellen wurden transient mit pICln wt, pICln S193, 195, 197A und pICln S193, 195, 197D in Form von GFP-Fusionsproteinen transfiziert und anschließend eine GFP-Immunpräzipitation aus Gesamtzelllysaten durchgeführt. Co-präzipitierte Proteine wurden mittels Tris-Glycin-SDS-PAGE und Western Blots analysiert.

5.6.2 Methylierung der Sm-Proteine in Abhängigkeit von pICln

Die Protein-Arginin-Methyltransferase 5 methyliert im Rahmen der U-snRNP-Biogenese spezifische Arginine der Sm-Proteine B, D1 und D3 symmetrisch [203]. Das Protein pICln dient hierbei als Adapterprotein indem es die Sm-Proteine bindet und zu PRMT5 rekrutiert [63, 69]. Welchen Einfluss die pICln-Phosphorylierung durch ULK1 auf die Methylierung der Sm-Proteine hat, wurde in einem *in vitro*-Methylierungsexperiment in Zusammenarbeit mit Jan Cox (Institut für Molekulare Medizin I, Universitätsklinikum Düsseldorf) untersucht. Dazu wurden die Sm-Proteine B, D1 und D3 mit wildtypischem pICln bzw. den Phosphorylierungsmutanten für 1,5 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend für 1 Stunde bei 37 °C durch Zugabe von Flag-PRMT5/His-WD45 und 2 µCi Adenosyl-L-Methionin, S-[Methyl-³H] methyliert. Die Analyse erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE, Amidoschwarz-Färbung und Autoradiographie. SmB wurde von PRMT5 sowohl in An- als auch Abwesenheit von pICln methyliert. Zudem erfolgte die Methylierung unabhängig vom pICln-Phosphorylierungsstatus.

Unter allen getesteten Bedingungen war die Methylierungsintensität von SmB nahezu identisch. Hinsichtlich SmD1 erfolgte in Abwesenheit von pICln keine Methylierung. Erst die Zugabe des Adapterproteins ermöglichte die Methylierung durch PRMT5. Die Aspartat-Mutante sorgte im Vergleich zur Alanin-Mutante und wildtypischem pICln für eine Reduktion der Methylierung von SmD1. Auch SmD3 konnte in Abwesenheit von pICln nicht durch PRMT5 methyliert werden. Durch Zugabe des Adapterproteins wurde die Methylierung ermöglicht. Sie erfolgte unabhängig vom Phosphorylierungsstatus in nahezu gleichem Maße (Abbildung 21).

Das beschriebene Experiment zeigte, dass pICln für die Rekrutierung von SmD1 und SmD3 zu PRMT5 benötigt wird. SmB kann hingegen unabhängig von dem Adapterprotein von PRMT5 *in vitro* methyliert werden. Des Weiteren scheint die pICln-Phosphorylierung eine inhibierende Wirkung auf die Methylierung von SmD1 zu haben.

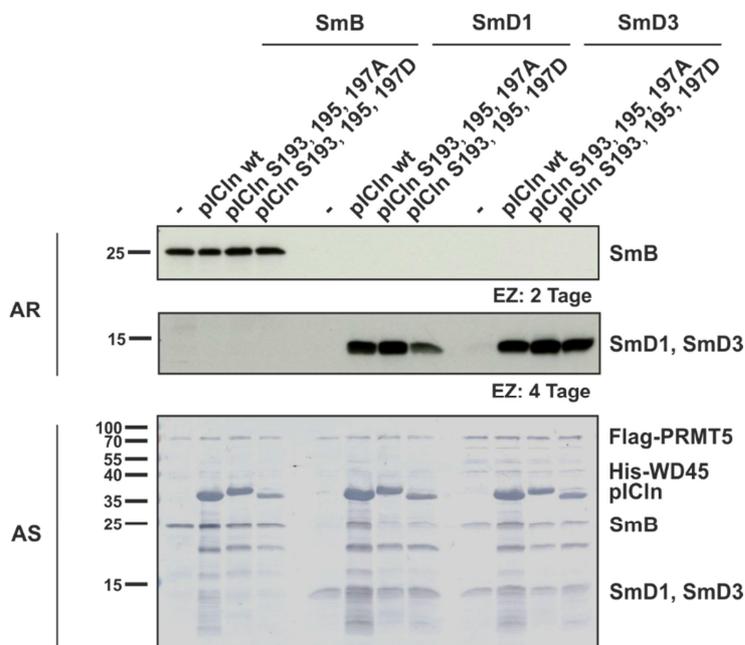


Abbildung 21: Einfluss von pICln auf die Sm-Protein-Methylierung durch PRMT5. 500 ng Sm-Proteine B, D1 bzw. D3 wurden mit analog molaren Mengen pICln wt, pICln S193, 195, 197A und pICln S193, 195, 197D (aufgereinigt aus *E. coli*) für 1,5 Std. auf Eis inkubiert und anschließend in einem *in vitro*-Methylierungsexperiment für 1 Std. bei 37 °C durch Zugabe von 150 ng Flag-PRMT5/His-WD45 und 2 μ Ci Adenosyl-L-Methionin, S-[Methyl- 3 H] methyliert. Die Analyse erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE, Amidoschwarz-Färbung und Autoradiographie. AR: Autoradiographie, AS: Amidoschwarz-Färbung, EZ: Expositionszeit.

5.6.3 Die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 inhibiert die Interaktion mit SmG

Da die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln die Zusammensetzung des PRMT5-Komplexes zwar nicht beeinflusst, hingegen aber die Methylierung von SmD1, wurde im nächsten Schritt der Einfluss auf die Interaktion der Sm-Proteine mit pICln untersucht. pICln bildet im Laufe der U-snRNP-Biogenese zwei Subkomplexe mit den Sm-Proteinen [70-72]: Zum einen bildet es einen Subkomplex mit SmB und SmD3, zum anderen formiert es einen sehr stabilen Ring mit SmD1/D2/F/E/G, welcher auch als 6S-Komplex bezeichnet wird. Innerhalb dieser Struktur interagiert pICln direkt mit SmD1 und SmG.

Die Sm-Proteine B, D1, D3 und G wurden zunächst *in vitro*-translatiert und dabei mit L-[³⁵S]Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurde in Zusammenarbeit mit Jan Cox ein *in vitro*-Interaktionsexperiment mit wildtypischem GST-pICln und den beiden Phosphorylierungsmutanten (aufgereinigt aus *E. coli* und gebunden an GSH-Sepharose) durchgeführt. Weder die Serin-zu-Alanin-Mutation noch die Serin-zu-Aspartat-Mutation beeinflusste die Bindung von pICln zu den Sm-Proteinen B, D3 und D1 (Abbildung 22 a–c). Hinsichtlich SmG erfolgte im Vergleich zum Wildtyp eine etwas stärkere Bindung mit der Alanin-Mutante. Die phosphorylierungsimitierende Aspartat-Mutante hingegen konnte nicht an SmG binden (Abbildung 22 d). Dies deutet darauf hin, dass die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln die Interaktion mit SmG inhibiert.

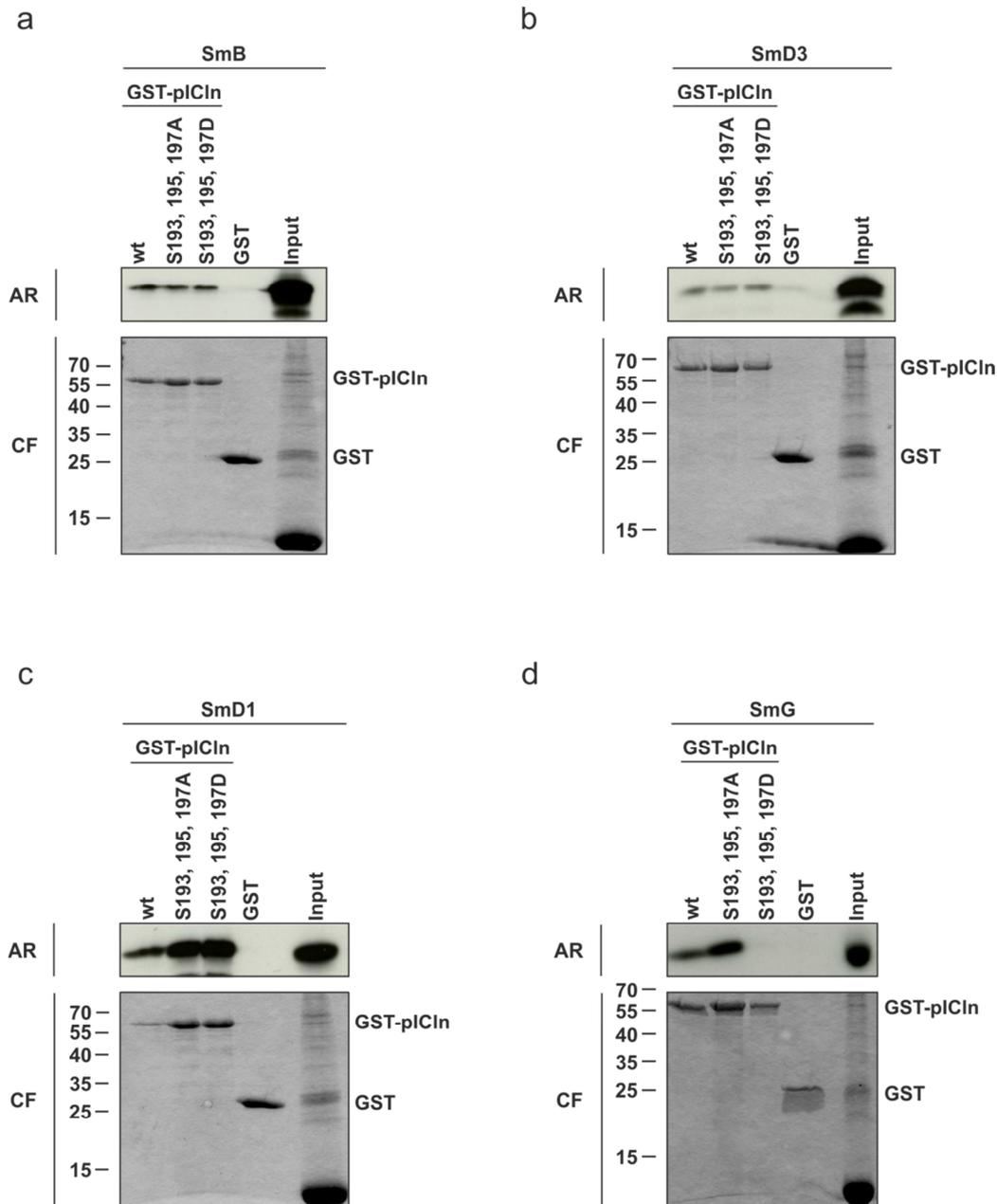


Abbildung 22: ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln inhibiert die Interaktion mit SmG. Sm-Proteine B (a), D3 (b), D1 (c) und G (d) wurden *in vitro*-translatiert, mit L- 35 S]Methionin markiert und in einem Interaktionsexperiment mit GST-pICln wt, -pICln S193, 195, 197A und -pICln S193, 195, 197D gebunden an GSH-Sepharose (aufgereinigt aus *E. coli*) für 1,5 Std. bei 4 °C inkubiert. Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgte über Tris-Glycin-SDS-PAGE und Autoradiographie. AR: Autoradiographie, CF: Coomassie-Färbung.

Um diese Hypothese zu validieren, wurde in Zusammenarbeit mit Stefan Klinker (Institut für physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) eine Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) durchgeführt. Dazu wurden die Interaktionspartner pICln wt bzw. pICln S193, 195, 197D und SmG bzw. SmB als GST-Fusionsprotein bakteriell exprimiert und mittels GSH-Sepharose aufgereinigt. Optional wurde anschließend der GST-

Tag mithilfe der *PreScission*-Protease entfernt. Zunächst wurde die Bindung zwischen pICln und SmB analysiert, um zum einen die Daten der Interaktionsstudien (Abbildung 22 a) zu verifizieren und zum anderen diese als Positivkontrolle zu testen. Arbeiten von Pesiridis und Kollegen zeigten eine Dissoziationskonstante (K_d) für die Interaktion zwischen pICln und dem SmD3-SmB-Dimer von 160 ± 40 nM [67]. SmB wurde zunächst als Ligand an die Chip-Oberfläche gekoppelt und daraufhin wurde wildtypisches pICln bzw. die Aspartat-Mutante als Analyt injiziert. Für die Affinität von pICln wt zu SmB wurde eine Dissoziationskonstante von $1,28 \pm 0,5$ nM ermittelt (Abbildung 23 a). Im Vergleich dazu zeigte die Aspartat-Mutante eine 10x geringere Affinität zu SmB (K_d $12,6 \pm 4,9$ nM) (Abbildung 23 b). Diese Daten scheinen im Gegensatz zu den Ergebnissen des Interaktionsexperiments zu stehen (Abbildung 22 a). Allerdings bestätigen sie die Befunde von Pesiridis und Kollegen, dass die Bindungskonstante der Interaktion zwischen SmB und pICln, unabhängig vom Phosphorylierungsstatus, im nanomolaren Bereich liegt, d. h. beide Proteine eine sehr hohe Affinität zueinander aufweisen.

Des Weiteren wurde die Bindung zwischen pICln und SmG untersucht. Die Messungen mit SmG als Ligand und pICln als Analyt ergaben keine auswertbaren Ergebnisse. Aus diesem Grunde sollte pICln immobilisiert und SmG als Analyt injiziert werden. Da der isoelektrische Punkt von pICln allein relativ niedrig ist (wt: pI 3,97; D-Mutante: pI 3,92), konnte keine Kopplung an den Chip erfolgen. Für das entsprechende GST-Fusionsprotein liegt der isoelektrische Punkt etwas höher (wt: pI 4,43; D-Mutante: pI 4,39), wodurch eine Immobilisierung möglich war. Für GST-pICln wt und SmG wurde eine Dissoziationskonstante von $11,5 \pm 1,5$ μ M ermittelt (Abbildung 23 c), für GST-pICln S193, 195, 197D und SmG hingegen von $84,7 \pm 14,7$ μ M (Abbildung 23 d). Die Affinität von SmG zur Aspartat-Mutante ist demnach 7x geringer als zum wildtypischen Protein. Insgesamt ist die Affinität von pICln zu SmG deutlich geringer als zu SmB.

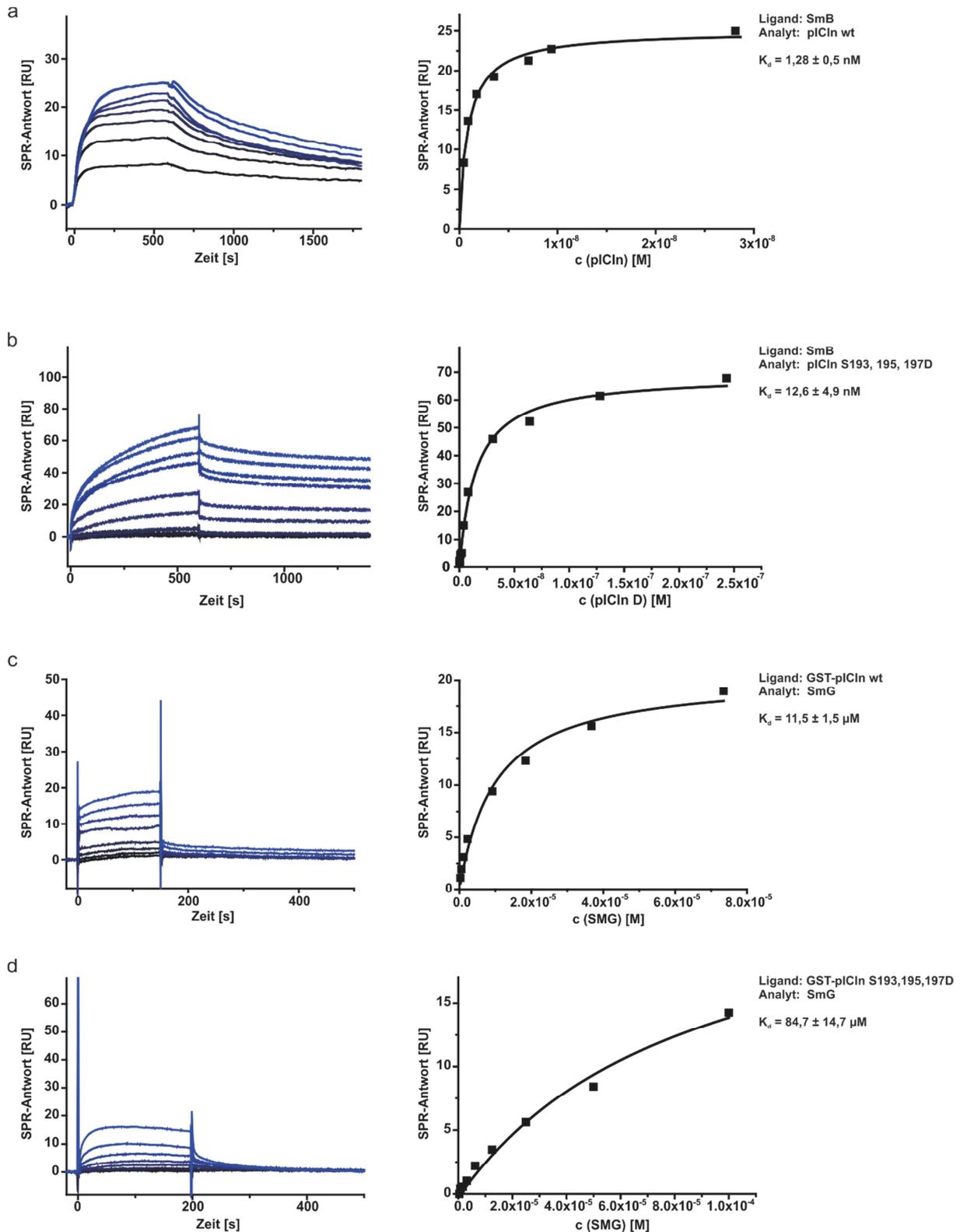


Abbildung 23: Affinität von pICln zu SmB bzw. SmG in Abhängigkeit vom pICln-Phosphorylungsstatus. Ermittlung der Dissoziationskonstanten der Interaktionen von SmB (Ligand) mit pICln wt (a) bzw. pICln S193, 195, 197D (b) (Analyten) und SmG (Analyt) mit GST-pICln wt (c) bzw. GST-pICln S193, 195, 197D (d) (Liganden) mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Alle Komponenten wurden aus *E. coli* aufgereinigt. Die Auswertung erfolgte mittels Steady-State-Analyse. RU: Resonanz-Unit. (SmB – pICln wt: n=3; SmB – pICln S193, 195, 197D: n=2; SmG – GST-pICln wt: n=3; SmG – GST-pICln S193, 195, 197D: n=3).

Sowohl die *in vitro*-Interaktionsstudien als auch die SPR-Messungen lassen erkennen, dass die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 zu einer Störung der Bindung mit SmG führt. Die Interaktion mit den Sm-Proteinen D1 und D3 ist wahrscheinlich nicht beeinflusst. Hinsichtlich SmB sind die Ergebnisse widersprüchlich: im *in vitro*-Interaktionsexperiment scheint die Phosphorylierung von pICln keinen Einfluss auf die Bindung mit SmB zu haben, wohingegen mithilfe der deutlich sensitiveren Methode der SPR eine 10x geringere Affinität der Aspartat-Mutante im Vergleich zum wildtypischen Protein ermittelt wurde.

5.6.4 ULK1 reguliert die Stabilität des 6S-Komplexes

Um den Einfluss der pICln-Phosphorylierung auf die Bindung der Sm-Proteine *in vivo* zu untersuchen, wurden Pulldown-Experimente mit GST-pICln wt und beiden Phosphorylierungsmutanten aus HEK293T S100-Extrakten durchgeführt. Anschließend erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thilo Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) via Massenspektrometrie (LC-MS/MS) eine quantitative Analyse der jeweils mit der Alanin- oder Aspartat-Mutante co-präzipitierten Sm-Proteine (normalisiert auf pICln-Wildtyp). Sowohl die phosphorylierungsimitierende Aspartat- als auch die phosphorylierungsinhibierende Alanin-Mutante co-präzipitierten SmB und SmD3 in nahezu gleicher Menge. Im Gegensatz dazu wurden die Komponenten des 6S-Komplexes SmD1/D2/F/E/G mit der Aspartat-Mutante in deutlich geringerer Menge co-präzipitiert als mit dem wildtypischen Protein. Die Bindekapazität der Alanin-Mutante hingegen war nur leicht beeinträchtigt (Abbildung 24 a). Diese Daten deuten darauf hin, dass die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln zwar keinen Einfluss auf den pICln-SmB/D3-Subkomplex hat, aber offensichtlich die Stabilität des 6S-Komplexes reguliert. Dabei sorgt die Phosphorylierung wahrscheinlich für die Öffnung des 6S-Rings zwischen pICln und SmG (Abbildung 22 und Abbildung 23), wodurch der Transfer der Sm-Proteine auf den SMN-Komplex und somit die weitere Reifung des U-snRNP-Partikels ermöglicht wird [70].

Durch eine Inhibition von ULK1 sollte der Transfer der Sm-Proteine des 6S-Komplexes auf den SMN-Komplex blockiert werden. Infolgedessen wäre eine Anreicherung der 6S-Struktur zu erwarten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden HEK293T-Zellen mit dem ULK1/2-spezifischen Inhibitor MRT67307 behandelt und eine Größenausschlusschromatographie mittels einer *Superdex 200 Increase 10/300 GL*-Säule im Vergleich zu wildtypischen HEK293T-Zellen durchgeführt. Anschließend erfolgte im Western Blot eine Analyse der Sm-Proteine des 6S-Komplexes. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen konnte in Inhibitor-behandelten Zellen eine Akkumulation der Sm-Proteine D1,

D2, E, F und G im Größenbereich zwischen ca. 70 und 130 kDa beobachtet werden (Abbildung 24 b und c, rote Box). Die Hemmung von ULK1 (und ULK2) führt somit wie erwartet zu einer Anreicherung der 6S-Struktur *in vivo*. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Massenspektrometrie, dass die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 die Menge an 6S-Komplex reduziert (Abbildung 24 a).

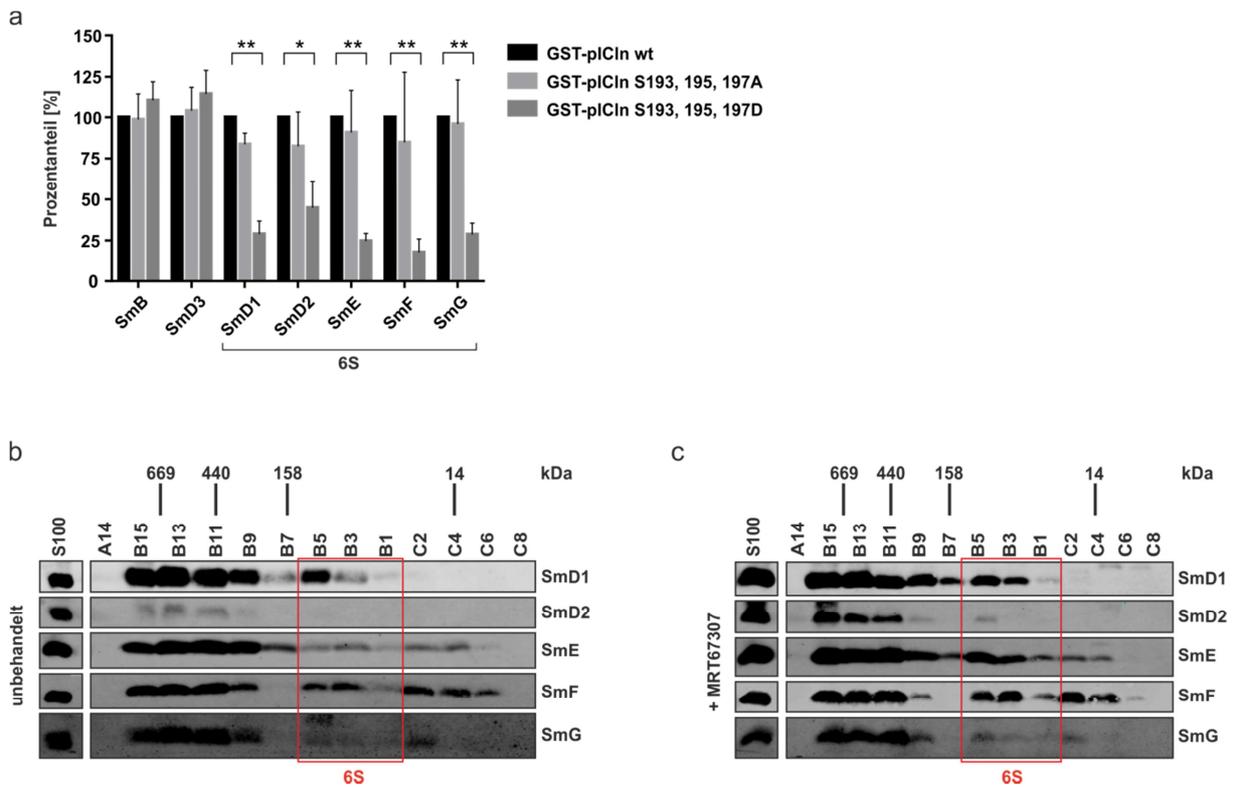
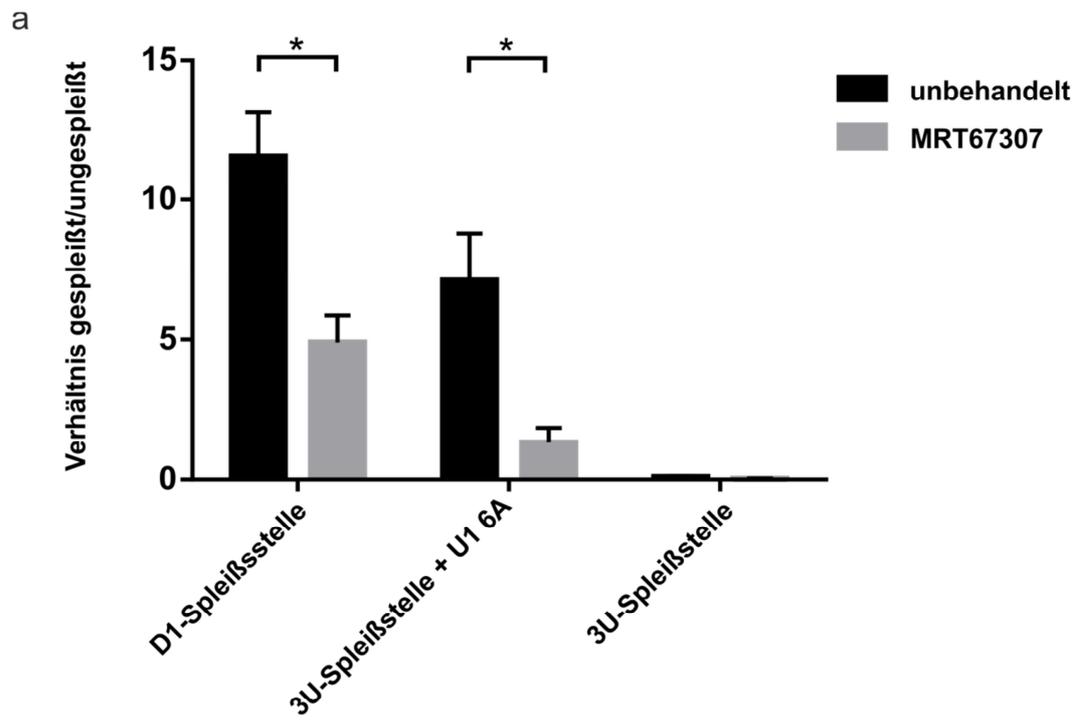


Abbildung 24: ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln beeinflusst die Stabilität des 6S-Komplexes. **a**, Pulldown mit GST-pICln wt, -pICln S193, 195, 197A und -pICln S193, 195, 197D gebunden an GSH-Sepharose (aufgereinigt aus *E. coli*) in HEK293T Cytoplasma-Extrakten (S100) über Nacht bei 4 °C. Co-aufgereinigte Sm-Proteine wurden mittels Massenspektrometrie (LC-MS/MS) quantifiziert und zu pICln wt normalisiert. **b**; **c**, HEK293T-Zellen wurden mit 10 μ M ULK1/2-Inhibitor MRT67307 (**c**) für 1 Std. behandelt und nach Cytoplasma-Extraktion (S100) wurde eine Größenausschlusschromatographie mittels einer *Superdex 200 Increase 10/300 GL*-Säule durchgeführt. Die Fraktionen A14–C8 wurden hinsichtlich der Sm-Proteine des 6S-Komplexes im Vergleich zu unbehandelten HEK293T-Zellen (**b**) mithilfe einer Tris-Tricin-SDS-PAGE und eines Western Blots analysiert. Rote Box: 6S-Komplex.

5.7 Eine Inhibition von ULK1 reduziert die spleißosomale Aktivität

Die vorangegangenen Daten zeigen, dass die Phosphorylierung von pICln die Stabilität des 6S-Intermediats reguliert. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung zudem einen Einfluss auf das reife U-snRNP als Bestandteil des Spleißosoms hat. Demzufolge wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Steffen Erkelenz und Dr. Frank Hillebrand (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) die spleißosomale Aktivität in Abhängigkeit von ULK1 analysiert. HEK293T-Zellen wurden mit dem ULK1/2-Inhibitor MRT67307 behandelt und mit verschiedenen Spleißreporterkonstrukten transfiziert (vgl. 4.2.2.4). Diese Reporter beinhalten zum einen die HIV-1 Spleißdonorstelle D1, welche von der endogenen U1-snRNA erkannt wird, und zum anderen eine künstliche 3U-Spleißdonorstelle, welche die Co-Expression einer U1 6A-snRNA benötigt. Mithilfe dieser Reporterkonstrukte konnten nach RNA-Isolation sowohl gespleißte als auch ungespleißte mRNA-Spezies mittels qPCR detektiert und quantifiziert werden. Die Expression der D1-Spleißstelle ermöglichte die Detektion der endogenen Spleißaktivität, wohingegen die U1 6A-abhängige 3U-Spleißstelle ausschließlich von neu synthetisierten U1 6A-snRNPs erkannt wird. Folglich kann mithilfe der 3U-Spleißstelle spezifisch die Spleißaktivität neu synthetisierter snRNPs detektiert werden.

In unbehandelten HEK293T-Zellen wurden sowohl mit dem U1-abhängigen D1-Reporter als auch dem U1 6A-abhängigen 3U-Reporter zum größten Teil gespleißte mRNA detektiert (D1: 90,89 %, 3U + U1 6A: 86,91 % Abbildung 25 b). Dies repräsentiert die normale Spleißaktivität in wildtypischen HEK293T-Zellen. Die Transfektion der 3U-Spleißdonorstelle ohne Co-Expression der U1 6A-snRNA diente als Negativkontrolle. Hierbei konnte nahezu keine Spleißaktivität detektiert werden (91,49 % ungespleißte mRNA, Abbildung 25 b). In den mit dem ULK1/2-Inhibitor MRT67307 behandelten HEK293T-Zellen konnte eine deutliche Reduktion des Verhältnisses von gespleißter zu ungespleißter mRNA beobachtet werden, sowohl für die D1- als auch die 3U-Spleißstelle mit co-exprimierter U1 6A-snRNA (Abbildung 25 a). Dementsprechend war ein prozentualer Anstieg ungespleißter mRNA zu detektieren: bezüglich der endogenen D1-Spleißstelle von 9,11 % auf 18,77 % und hinsichtlich der artifiziellen U1 6A-abhängigen 3U-Spleißstelle von 13,09 % auf 44,8 % (Abbildung 25 a). Die Inhibition von ULK1 beeinflusst demnach nicht nur die Neusynthese des U1 6A-snRNP-Partikels, sondern reduziert zudem das endogene U1-abhängige Spleißen. ULK1 steht also in einem direkten Zusammenhang mit der Spleißmaschinerie und seiner Aktivität.



b

Mittelwerte	Ø gespleißt [%]			Ø ungespleißt [%]		
	unbehandelt	MRT67307	Differenz	unbehandelt	MRT67307	Differenz
D1-Spleißstelle	90,89	81,23	-9,66	9,11	18,77	+9,66
3U-Spleißstelle	8,51	2,59	-5,92	91,49	97,41	+5,92
3U-Spleißstelle + U1 6A	86,91	55,20	-31,72	13,09	44,80	+31,72

Abbildung 25: Eine Inhibition von ULK1 reduziert die spleißosomale Aktivität. a; b, HEK293T-Zellen wurden für 3 Std. mit 30 μ M ULK1/2-Inhibitor MRT67307 behandelt und transient mit verschiedenen Spleißreporterkonstrukten transfiziert (vgl. 4.2.2.4). Nach 20 Std. wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt und das Verhältnis zwischen gespleißter und ungespleißter mRNA ermittelt (a). Die entsprechenden Mittelwerte einschließlich Differenzen zwischen Inhibitor-behandelten und unbehandelten gespleißten bzw. ungespleißten Formen sind in (b) aufgelistet (n = 3).

5.8 Einfluss des ULK1-Knockdowns auf die Motoneuronenentwicklung im *D. rerio*-Embryo

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist unter anderem charakterisiert durch die Degeneration der Motoneuronen im Rückenmark und wird verursacht durch eine Mutation im *survival of motor neuron (SMN)*-Gen, so dass kein funktionales SMN-Protein exprimiert wird [3, 204]. Dadurch wird unter anderem nachhaltig die U-snRNP-Biogenese gestört [10, 11, 205]. McWhorter und Kollegen zeigten im Jahr 2003, dass ein *smn-Knockdown* im Zebrafisch-Embryo (*D. rerio*) zu einem fehlerhaften Motoneuronenwachstum führt, welches durch verkürzte und falsch verzweigte Neurone charakterisiert ist [206]. Darüber hinaus beobachteten Winkler und Kollegen zwei Jahre später einen ähnlichen Phänotyp nach einem *icln-Knockdown* (*pICln*-Ortholog in *D. rerio*) [205].

Zebrafisch-Embryos sind zur Untersuchung der SMA-Pathophysiologie besonders geeignet, da die Entwicklung der Motoneurone durch die Transparenz des Organismus gut beobachtet werden kann. Mittels Antisense-Morpholino-Oligos, die wie *small interfering RNAs* wirken, kann die Genexpression spezifisch herunterreguliert werden [207]. Da ULK1 durch Phosphorylierung von pICln und Auflösung des 6S-Komplexes eine entscheidende Rolle in der U-snRNP-Biogenese spielt und zudem an der neuronalen Differenzierung beteiligt ist [129, 130], wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Heike Diekmann (Institut für Experimentelle Neurologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mithilfe von *ulk1*-Morpholinos ein *Knockdown* in Zebrafisch-Embryos erzeugt, um den Einfluss von ULK1 auf die Motoneuronenentwicklung zu untersuchen. *D. rerio* besitzt zwei ULK1-Formen: ULK1a und ULK1b. Diese weisen mehrere Isoformen auf. In Tabelle 3 sind die Homologien der verschiedenen ULK1a- und ULK1b-Isoformen im Vergleich zu humanem ULK1 (hULK1) dargestellt.

Tabelle 3: Sequenzielle Homologien zwischen humanem ULK1 (hULK1) und den ULK1a- bzw. ULK1b-Isoformen des Zebrafisches. Alignments mithilfe *EMBOSS Needle* [201] durchgeführt.

ULK1a		ULK1b	
<i>Accession number</i>	Homologie zu hULK1 [%]	<i>Accession number</i>	Homologie zu hULK1 [%]
B0R0S0	20,0	A5PLA2	19,2
F1R4S2	48,2	E9QIB7	59,5
F1R9T2	25,1		
B3DJH7	49,8		

Bezüglich des pICln-Homologs icln weist der Zebrafisch vier verschiedene Isoformen auf. Diese tragen zwar das Serin 195, die Serine 193 und 197 sind jedoch nicht vorhanden (Abbildung 26), d. h. zwei der drei in humanem pICln identifizierten ULK1-abhängigen Phosphorylierungsstellen existieren im

Zebrafisch nicht. Insgesamt sind humanes pICln und Zebrafisch-icln gemäß Alignment mittels *EMBOSS Needle* [201] zu ca. 67 % identisch. Eventuell liegen potenzielle Ulk1-abhängige Phosphorylierungsstellen in anderen Bereichen des Proteins.

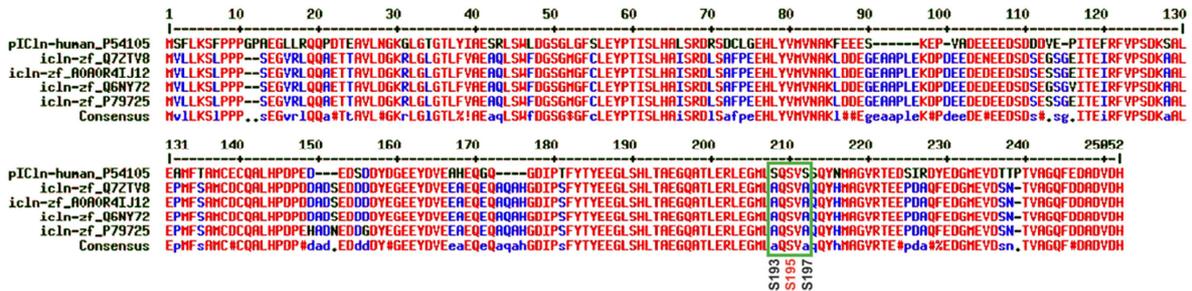


Abbildung 26: Sequenzvergleich des humanen pICln-Proteins mit den vier icln-Isoformen des Zebrafisches. Die vier *D. rerio*-icln-Formen weisen ebenso wie das humane pICln das Serin an Position 195 auf, die Serine 193 und 197 sind nicht vorhanden (grüner Kasten). Humanes und Zebrafisch-Protein (zf) sind ca. 67 % identisch zueinander. Alignments wurden mithilfe von *MultAlin* [208] und *EMBOSS Needle* [201] durchgeführt.

Für die Generierung eines *ulk1-Knockdowns* wurden im Ein- bis Zweizellstadium *ulk1a*- und *ulk1b*-Morpholinos in die Embryos injiziert und diese 30 Stunden bei 28,5 °C inkubiert. Anschließend erfolgten eine Überprüfung der *Knockdown*-Effizienz per Western Blot und die fluoreszenzmikroskopische Analyse mithilfe des *znp-1*-Antikörpers, welcher spezifisch die Motoneurone im Zebrafisch bindet. Der Western Blot zeigte, dass nach Injektion von 7 ng bzw. 5-10 ng *ulk1a/b*-Morpholino eine *Knockdown*-Effizienz von 62 % bzw. 59 % im Vergleich zu unbehandelten Embryos erzielt wurde. 14 ng Morpholino hingegen reduzierten die *Ulk1a/b*-Expression nur um 35 % (Abbildung 27 a). In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte sowohl in wildtypischen Embryos als auch in Embryos, die mit einem Kontroll-Morpholino behandelt wurden, eine reguläre Entwicklung der Motoneurone beobachtet werden. Die Neurone waren langgestreckt und normal verzweigt (Abbildung 27 b, c). Nach Injektion der *ulk1a/b*-Morpholinos trat unabhängig von der injizierten Menge keine Veränderung bzw. Beeinträchtigung der Motoneuronenentwicklung ein. Die Neurone waren ebenfalls langgestreckt und normal verzweigt (Abbildung 27 d-f).

Mithilfe der verwendeten *ulk1a/b*-Morpholinos konnte kein Effekt auf die Motoneuronenentwicklung im Zebrafisch-Embryo beobachtet werden. Eventuell ist die Anzahl untersuchter Embryos zu gering und sollte für eine eindeutige Aussage erhöht werden.

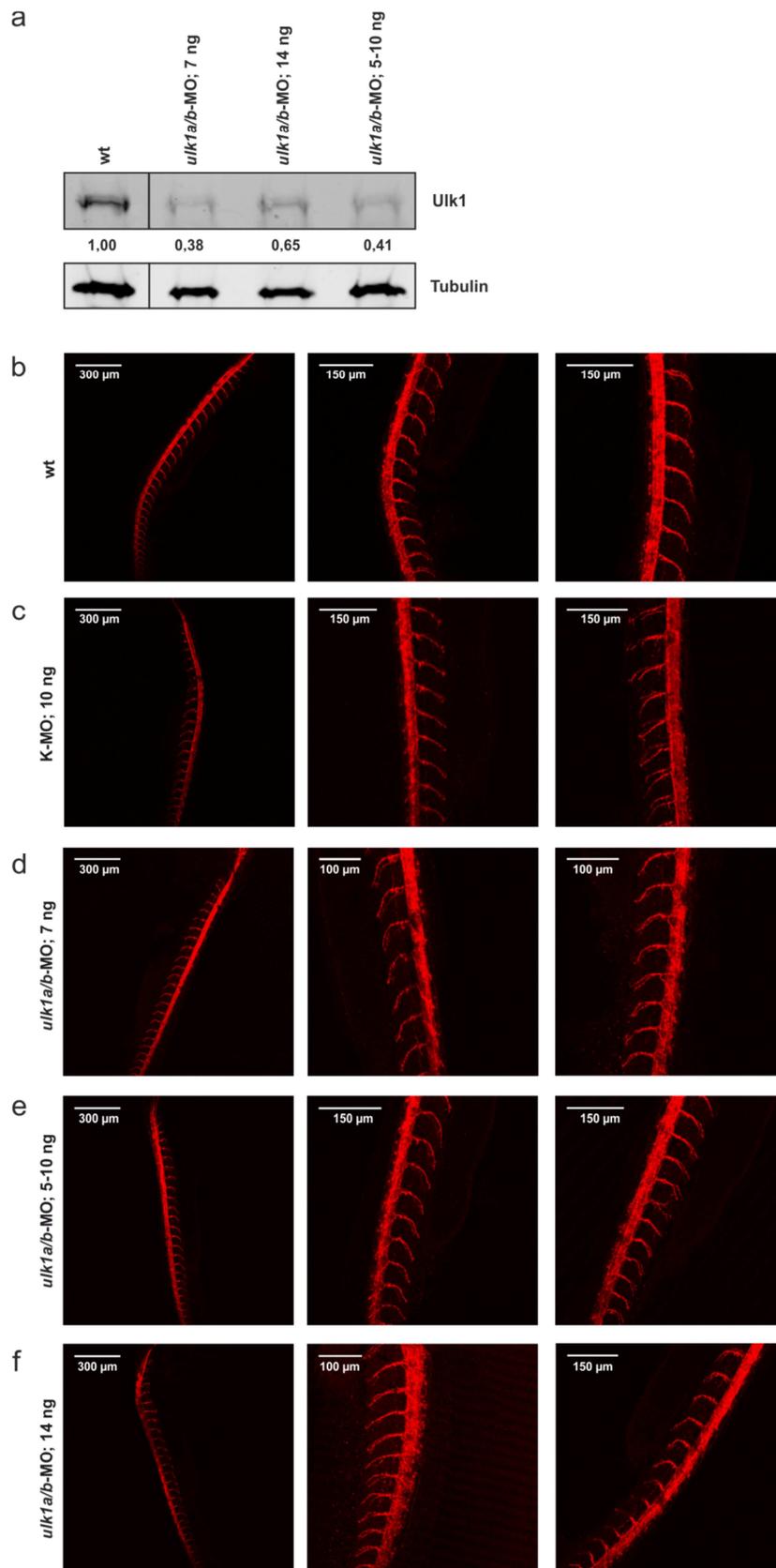


Abbildung 27: ULK1-Knockdown in *D. rerio*-Embryos zeigt keinen Effekt auf die Motoneuronenentwicklung. *D. rerio*-Embryos wurden im Ein- bis Zweizellstadium mit 7 ng; 5-10 oder 14 ng *ulk1a* und *ulk1b*-Morpholinos (MO) behandelt und 30 Std. bei 28,5 °C inkubiert. **a**, Überprüfung der *Knockdown*-Effizienz durch Western Blot. **b**, Immunfluoreszenz-Analyse der Motoneuronenentwicklung mithilfe des *znp1*-Antikörpers und konfokaler Laserscannmikroskopie (wt: n = 9; Kontroll-MO, 10 ng: n = 8; *ulk1a/b*-MO, 7 ng: n = 12; 5-10 ng: n = 8; 14 ng: n = 8).

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Serin/Threonin-Kinase ULK1 als neuen Regulator der U-snRNP-Biogenese identifizieren. Die ULK1-abhängige Phosphorylierung des C-Terminus von pICln sorgt für die Öffnung der 6S-Struktur und initiiert somit die weiteren Schritte der Zusammensetzung des Spleißosoms.

6 DISKUSSION

6.1 Der PRMT5-Komplex als neuer Interaktionspartner der Serin-Threonin-Kinase *Unc-51-like kinase 1 (ULK1)*

Im Rahmen massenspektrometrischer Interaktionsstudien wurde das Methylosom (PRMT5-Komplex), bestehend aus der Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5), dem Methylosom-Protein 50 (WD45) und dem *chloride conductance regulatory protein* (pICln), als neuer Interaktionspartner der Serin-Threonin-Kinase *Unc-51-like kinase 1 (ULK1)* identifiziert [123]. Das Methylosom ist ein wichtiger Regulator der Biogenese der *uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles* (U-snRNPs), der Bestandteile des Spleißosoms [49]. Die Proteinkinase ULK1 ist bisher überwiegend als Induktor der Autophagie bekannt [199]. Sie spielt aber auch eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung [129-132]. In der vorliegenden Arbeit konnte der PRMT5-Komplex als neuer Interaktionspartner von ULK1 bestätigt und darüber hinaus pICln als neues Phosphorylierungssubstrat von ULK1 identifiziert werden.

Mithilfe einer Immunpräzipitation aus Cytoplasma-Extrakten von ULK1-überexprimierenden Zellen konnte der PRMT5-Komplex als neuer Interaktionspartner von ULK1 verifiziert werden. Zudem zeigte ein Nährstoffmangel, induziert durch EBSS, keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen ULK1 und dem PRMT5-Komplex (Abbildung 10 a). Sie scheint somit unabhängig von der Autophagie zu erfolgen. Das Protein *mammalian target of rapamycin* (mTOR) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Autophagie [209-211]: Unter nährstoffreichen Bedingungen phosphoryliert mTOR die Autophagie-Komplex-Komponenten ULK1 und ATG13 und hemmt auf diese Weise die Autophagie. Infolge eines Nährstoffmangels wird mTOR inhibiert, ULK1 dephosphoryliert und aktiviert, und Autophagie induziert [109]. Neben dem Mangelmedium EBSS kann Autophagie mithilfe des mTOR-Inhibitors Rapamycin stimuliert werden [212]. Um die Autophagie-Unabhängigkeit der Interaktion zwischen ULK1 und dem PRMT5-Komplex detaillierter zu untersuchen, könnte diese Substanz verwendet werden. Darüber hinaus kann mit Rapamycin der direkte Einfluss von mTOR auf die Interaktion ergründet werden.

Die Immunpräzipitation mit einer trunkierten Form von ULK1, der die C-terminale Domäne fehlt, zeigte, dass die Interaktion von ULK1 mit dem PRMT5-Komplex unabhängig von dieser Domäne erfolgt (Abbildung 10 b). Für die Bildung des Autophagie-induzierenden Komplexes bestehend aus ULK1, ATG13, ATG101 und FIP200 ist die C-terminale Domäne von essenzieller Bedeutung [118]. Dieses Experiment bekräftigt die Annahme der Autophagie-unabhängigen Interaktion zwischen ULK1 und dem PRMT5-Komplex. In zukünftigen Experimenten sollte mit weiteren trunkierten Formen die

genaue Bindedomäne von ULK1 mit dem PRMT5-Komplex ermittelt werden. ULK1 weist N-terminal eine Kinase-Domäne auf, gefolgt von einer Serin/Prolin-reichen Region [213]. Letztere sind häufig in Protein-Protein-Interaktionen involviert [214]. Sowohl die Deletion der Kinase-Domäne als auch der Serin/Prolin-reichen Region wäre somit ein interessanter Ansatzpunkt.

Untermauert wurde die neu identifizierte Interaktion durch eine Größenausschlusschromatographie (SEC) (Abbildung 11). ULK1 ist neben dem Autophagie-Komplex, welcher eine Größe von ca. 2 MDa aufweist, Teil eines weiteren Komplexes, der zwischen 400 und 500 kDa groß ist [118]. Dieser co-migriert mit dem Methylosom, bestehend aus PRMT5, WD45 und pICln. Dies deutet daraufhin, dass die Interaktion auch *in vivo* erfolgt. Sowohl die Immunpräzipitation mit der trunkierten ULK1-Form (Abbildung 10 b) als auch die Gelfiltration (Abbildung 11) zeigen, dass der PRMT5-Komplex nicht mit dem ULK1-Autophagie-Komplex (FIP200, ATG13, ATG101) interagiert, sondern mit einem davon unabhängigen ULK1-Komplex. Welche Komponente des PRMT5-Komplexes den direkten Interaktionspartner von ULK1 darstellt, ist ungeklärt. Diese Fragestellung sollte mittels weiterer Interaktionsstudien analysiert werden. Da ULK1 pICln phosphoryliert (Abbildung 12 a), könnte die Interaktion über eben dieses Adapterprotein erfolgen. In dem Fall wäre eine transiente Interaktion denkbar, da eine Phosphorylierungsreaktion eine hohe Umsatzrate aufweist [87]. Um die Bedeutung der Interaktion zwischen ULK1 und dem Methylosom, auch im Hinblick auf die U-snRNP-Biogenese, näher zu untersuchen, sollte die vollständige Komplexzusammensetzung entschlüsselt und mögliche weitere Proteinkomponenten analysiert werden. Eventuell interagiert ULK1 mit Teilen des an der U-snRNP-Biogenese maßgeblich beteiligten SMN-Komplexes [49], dessen Aktivität durch Phosphorylierung reguliert wird [81]. Der SMN-Komplex besteht aus mehreren Phosphoproteinen [36], welche weitere Substrate von ULK1 darstellen könnten.

Die Komplexzusammensetzung des Methylosoms wird durch einen ULK1-*Knockdown* nicht beeinflusst. Der Komplex co-sedimentiert ebenfalls zwischen 400 und 600 kDa (Abbildung 16 b). Zur ULK-Proteinfamilie gehört neben ULK1 auch die Serin/Threonin-Kinase ULK2. Im Rahmen der Autophagie sind beiden Kinasen funktionell redundant [110]. Da sich die Zusammensetzung des Methylosoms bei Abwesenheit von ULK1 nicht ändert, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob ULK2 auch im Zusammenhang mit der U-snRNP-Biogenese die Funktion von ULK1 übernehmen kann. Möglicherweise kompensiert ULK2 bei Abwesenheit von ULK1 dessen Funktion, so dass die Zusammensetzung des Komplexes nicht beeinflusst wird. Allerdings scheint sowohl eine dauerhafte Dephosphorylierung bzw. Phosphorylierung von pICln, repräsentiert je durch die Überexpression einer Alanin- bzw. Aspartat-Mutante, ebenfalls keinen Einfluss auf die Komposition des Methylosoms zu haben (Abbildung 20). Im Hinblick auf die übereinstimmenden

Phosphorylierungsstellen von ULK1 und ULK2 (Tabelle 2) besteht wahrscheinlich kein direkter Zusammenhang zwischen der ULK1/2-abhängigen Phosphorylierung von pICln und der Komposition des PRMT5-Komplexes.

6.2 pICln als neues Phospho-Substrat der ULK-Familie

Die Daten meiner Masterarbeit und die der vorliegenden Arbeit identifizierten das Adapterprotein pICln als ein neues Phospho-Substrat der ULK-Familie (Abbildung 12) [189]. Sowohl ULK1, ULK2 als auch ULK3, die in ihren Kinase-Domänen eine gewisse Homologie zueinander aufweisen (Tabelle 1), phosphorylieren pICln *in vitro*. Im Vergleich zu ULK1 und ULK3 zeigte ULK2 eine sehr schwache Phosphorylierungsaktivität gegenüber pICln (Abbildung 12). Mithilfe der Massenspektrometrie konnten in pICln für ULK1 und ULK3, aber auch für ULK2 mehrere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die überwiegend im C-terminalen Bereich liegen (Tabelle 2, Abbildung 18). Sowohl für ULK1 als auch für ULK2 wurden die Serine der Positionen 193, 195 und 197 ermittelt und mittels einer Dreifach-Alanin-Mutante in *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten für ULK1 bestätigt (Abbildung 19). ULK2 kann wie bereits erwähnt die Funktion von ULK1 im Rahmen der Autophagie ersetzen [110]. Die übereinstimmenden Phosphorylierungsstellen sind ein weiterer Hinweis dafür, dass ULK2 die Funktion von ULK1 in der U-snrNP-Biogenese ebenfalls übernehmen könnte. Allerdings sollten diese Phosphorylierungsstellen und zudem das Serin an Position 210 mithilfe von entsprechenden Alanin-Mutationen in Phosphorylierungsexperimenten für ULK2 validiert werden. ULK3 wurde während der weiteren Experimente dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da es laut der Größenausschlusschromatographie nicht mit den Hauptfraktionen des PRMT5-Komplexes und ULK1 co-migriert und stattdessen überwiegend als Monomer vorzuliegen scheint (Abbildung 13). Der Teil von ULK3, der in einem Größenbereich von ca. 600 kDa sedimentierte, befand sich in der ersten proteinbeinhaltenden Fraktion, die während der Gelfiltration fraktioniert wurde (Abbildung 13). Die verwendete *Superdex 200*-Säule trennt Komplexe ausschließlich im Bereich von 10 bis 600 kDa auf. Möglicherweise sind dies entweder Protein-Aggregate von ULK3, da in dieser Fraktion noch keine Auftrennung erfolgt, oder aber ULK3 ist Bestandteil eines oder mehrerer Komplexe, die größer als 600 kDa sind und somit nicht in die Säulenmatrix eindringen.

Im Rahmen weiterer Experimente konnte die Phosphorylierung von pICln durch ULK1 zudem *in vivo* gezeigt werden. ULK1 und PRMT5-Komplex-beinhaltende SEC-Fraktionen wildtypischer HEK293T-Zellen sind in der Lage rekombinantes pICln zu phosphorylieren (Abbildung 17 a). Die Phosphorylierungsaktivität der entsprechenden Fraktionen ULK1-depletierter HEK293T-Zellen

hingegen ist deutlich geringer bezüglich pICln (Abbildung 17 b). Die erste Fraktion B8 wildtypischer HEK293T-Zellen beinhaltet zwar eine höhere ULK1-Menge als die nachfolgenden, zeigte aber keine Phosphorylierungsaktivität bezüglich pICln (Abbildung 17 a). Wie oben bereits erwähnt, weist die verwendete *Superdex 200*-Säule einen Auftrennungsbereich von 10 bis 600 kDa auf. Das in der Fraktion B8 vorhandene ULK1 ist entweder aggregiert oder aber Teil des ULK1-Autophagie-Komplexes, welcher mit einer Größe von ca. 2 MDa die Säulenkapazität übersteigt. Da die Interaktion zwischen ULK1 und dem PRMT5-Komplex unabhängig vom ULK1-Autophagie-Komplex ist, erfolgt demzufolge keine Phosphorylierung von pICln durch ULK1 in Fraktion B8. Die Generierung Phosphorylierungsstellen-spezifischer Antikörper gegen die Serine 193, 195 und 197 würde ferner die Möglichkeit bieten zur positionsabhängigen Analyse der endogenen pICln-Phosphorylierung in Abhängigkeit von ULK1 mittels Western Blots.

Gruss und Kollegen verglichen die an der U-snRNP-Biogenese beteiligten Proteine hinsichtlich ihrer potenziellen Phosphorylierungsstellen [36]. Sie zeigten, dass neben dem SMN-Komplex und pICln die Sm-Proteine, insbesondere SmD2 und SmF, mehrere Serin-Phosphorylierungsstellen aufweisen. In zukünftigen Phosphorylierungsexperimenten sollten demnach nicht nur die Komponenten des SMN-Komplexes, sondern auch die Sm-Proteine als mögliche weitere Substrate von ULK1 überprüft werden.

6.3 Der Einfluss von pICln auf die Methylierung der Sm-Proteine B, D1 und D3

Im Rahmen der U-snRNP-Biogenese werden die Sm-Proteine B, D1 und D3 durch PRMT5 methyliert [63, 69]. Die symmetrische Dimethylierung der Arginin-Reste steigert die Bindungsaffinität der Sm-Proteine für SMN *in vitro* [82, 83]. Es wird postuliert, dass pICln als Adapterprotein agiert, indem es SmB, SmD1 und SmD3 bindet und zu PRMT5 rekrutiert [49, 64, 69]. Die Daten dieser Arbeit zeigen jedoch, dass PRMT5 sowohl in An- als auch Abwesenheit von pICln und unabhängig vom pICln-Phosphorylierungsstatus in der Lage ist SmB *in vitro* zu methylieren (Abbildung 21). SmD1 und SmD3 hingegen benötigen pICln, um von PRMT5 methyliert zu werden. Dies bestätigt die Daten von Pesirids und Kollegen, die zeigten, dass pICln die PRMT5-Aktivität bezüglich der SmD3-Methylierung stimuliert [67]. Darüber hinaus erfolgt die Methylierung für SmD3 unabhängig vom pICln-Phosphorylierungsstatus, wohingegen phosphoryliertes pICln, repräsentiert durch die Aspartat-Mutante, einen inhibierenden Einfluss auf die Methylierung von SmD1 zu haben scheint (Abbildung 21). Diese Abhängigkeiten wurden *in vivo* bisher nicht untersucht. Es ist bekannt, dass pICln im Kontext der U-snRNP-Biogenese mindestens zwei Subkomplexe bildet: zum einem mit SmB/D3 und

zum anderen mit den Sm-Proteinen D1, D2, F, E und G [69-71]. Letzterer wird auch als 6S-Komplex bezeichnet [70, 72] und sedimentiert in der Gelfiltration zwischen 70 und 150 kDa (Abbildung 11, Abbildung 24 b und c). Eventuell hat die Phosphorylierung von pICln durch ULK1, repräsentiert durch die Aspartat-Mutante, ausschließlich einen Einfluss auf die Methylierung des 6S-Komplexes, nicht hingegen des pICln-SmB/D3-Subkomplexes, da die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln lediglich die Methylierung von SmD1 durch PRMT5 zu blockieren scheint. Die pICln-Phosphorylierung durch ULK1 reguliert demnach möglicherweise die PRMT5-bedingte Sm-Protein-Methylierung im 6S-Komplex. Mithilfe pICln-depletierter Zellen könnte zunächst mittels massenspektrometrischer Analysen die Methylierung der Sm-Proteine in Abhängigkeit von pICln *in vivo* untersucht werden. Ferner könnte in diesen Zellen zum einen die Alanin- und zum anderen die Aspartat-Mutante überexprimiert und anschließend massenspektrometrisch hinsichtlich Sm-Protein-Methylierung analysiert werden, um den Einfluss der ULK1-bedingten pICln-Phosphorylierung *in vivo* zu ergründen.

An welche Komponente des PRMT5-Komplexes die sieben Sm-Proteine direkt binden, wurde bislang nicht im Detail untersucht. Erfolgt die Bindung ausschließlich an pICln oder spielen PRMT5 und WD45 ebenfalls eine Rolle? Wird die Interaktion der Sm-Proteine mit dem PRMT5-Komplex durch die ULK1-abhängige Phosphorylierung beeinflusst bzw. reguliert? Da SmB für seine Methylierung das Adapterprotein pICln nicht zu benötigen scheint, bindet es möglicherweise unmittelbar an den PRMT5-WD45-Subkomplex. Wohingegen SmD1 und SmD3, die pICln für die Methylierung benötigen, gegebenenfalls direkt mit diesem Protein interagieren. Diese Fragestellung sollte im Rahmen von Interaktionsstudien näher untersucht werden. Pu und Kollegen zeigten eine Bindung der Sm-Proteine mit pICln im Aminosäurebereich zwischen 37 und 174 [67, 73]. Der Interaktionsbereich ist demnach begrenzt auf die PH-Domäne (inklusive der sauren Domäne 1) und die saure Domäne 2 (vgl. Abbildung 18) [67]. Dabei bindet pICln an die Sm-Motive der Sm-Proteine, nicht an die RG-Domäne (Abbildung 28) [69]. Der von ULK1 phosphorylierte C-Terminus scheint demnach nicht primär an der Interaktion mit den Sm-Proteinen beteiligt zu sein, könnte aber durch potenzielle phosphorylierungsabhängige Konformationsänderungen dennoch eine Rolle spielen.



Abbildung 28: SmD1-Proteinsequenz inklusive der Sm-Motive 1 und 2 und der RG-Domäne [215]

6.4 Regulation der Stabilität des 6S-Komplexes und der spleißosomalen Aktivität durch die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln

Der 6S-Komplex stellt ein kinetisch sehr stabiles Zwischenprodukt innerhalb der U-snRNP-Biogenese dar (vgl. 2.2.1.1) [69, 70]. Solange pICln an die Sm-Proteine D1, D2, F, E und G bindet, ist die Übertragung dieser auf die U-snRNA blockiert. [63, 70, 73]. Dies gilt ebenso für den pICln-SmB/D3-Subkomplex. pICln wirkt somit als *assembly chaperone* der U-snRNP-Biogenese [70]. Die Daten von Grimm und Kollegen deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen pICln und SmG eine Sollbruchstelle bzw. einen *mobility hotspot* darstellt und die Öffnung der 6S-Struktur eben genau zwischen diesen beiden Proteinen erfolgt [72]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Hypothese. Die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln, repräsentiert durch die Aspartat-Mutante, verhindert im *in vitro*-Interaktionsexperiment die Bindung an SmG (Abbildung 22 d). Sowohl die phosphorylierungsinhibierende Alanin-Mutante als auch wildtypisches pICln können SmG binden, wobei die Interaktion mit der Alanin-Mutante stärker zu sein scheint. Rekombinant in *E. coli* exprimierte Proteine tragen in der Regel keine posttranslationalen Modifikationen, d. h. alle drei pICln-Proteine liegen nicht phosphoryliert vor (Abbildung 14 a). Möglicherweise wird wildtypisches pICln, dessen Serine an den Positionen 193, 195 und 197 vorhanden sind, während der Inkubation mit dem *in vitro*-Translat durch die im Retikulozyten-Lysat vorhandenen Kinasen und ATP phosphoryliert, was daraufhin zu einer verringerten Bindungseffizienz mit SmG führt (Abbildung 22 d). Die Alanin-Mutante hingegen kann an den Positionen 193, 195 und 197 nicht phosphoryliert werden, die Bindung an pICln wird in dem Fall nicht beeinflusst. Die Interaktion der Sm-Proteine B, D3 und D1 mit pICln hingegen ist weder durch die phosphorylierungsinhibierende noch durch die -imitierende Mutante beeinflusst (Abbildung 22 a–c).

Für die Interaktion zwischen SmG bzw. SmB und pICln in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) entsprechende Dissoziationskonstanten ermittelt (Abbildung 23). Die Phosphorylierung von pICln sorgt für einen 7x höheren K_d -Wert bezüglich der Interaktion mit SmG im Vergleich zu wildtypischem, nicht-phosphoryliertem pICln (Abbildung 23 c und d), d. h. die Assoziation von SmG zu phosphoryliertem pICln ist deutlich geringer als zum nicht-phosphorylierten Protein. Diese Daten bekräftigen die Ergebnisse des Interaktionsexperiments. Die Bindungskonstanten der Interaktionen zwischen pICln und SmG liegen im zweistelligen mikromolaren Bereich, wohingegen die K_d -Werte bezüglich pICln und SmB im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich liegen (Abbildung 23 a und b). Die Affinität von pICln zu SmG scheint somit deutlich geringer zu sein als zu SmB. Dies unterstützt die These von Grimm und Kollegen bezüglich der Sollbruchstelle zwischen pICln und SmG [72].

Bezüglich SmB erscheinen die Ergebnisse des Interaktionsexperiments und der SPR-Messungen zunächst widersprüchlich. Im radioaktiven Bindungsexperiment ist die Bindung von SmB zu pICln

weder durch die phosphorylierungsinhibierenden noch die -imitierenden Mutationen beeinflusst (Abbildung 22 a). Die Bindungskonstante der Interaktion zwischen wildtypischem pICln und SmB hingegen ist 10x geringer im Vergleich zur Bindung mit der Aspartat-Mutante (Abbildung 23 a und b). Die im Interaktionsexperiment verwendeten Proteinmengen liegen allerdings über dem K_d -Wert. Aus diesem Grund kann mit diesem Experiment ein Einfluss der Phosphorylierung möglicherweise nicht detektiert werden. Im Vergleich dazu sind SPR-Messungen deutlich sensitiver, es erfolgt die genaue Ermittlung des Gleichgewichts zwischen Produkt (Interaktion) und Edukt (einzelne Interaktionspartner). Entscheidend sind allerdings die tatsächlichen Konzentrationen der Proteine in der Zelle, um eine Aussage treffen zu können, ob die Mutationen eine Auswirkung auf die Interaktion haben. Eventuell hat die Phosphorylierung von pICln im Zusammenhang mit der SmB-Interaktion keine physiologische Relevanz. Die K_d -Werte beider SmB-Messungen (pICln wt und Aspartat-Mutante) liegen im nanomolaren Bereich, was im Allgemeinen eine sehr hohe Bindungsaffinität beschreibt. Diese Daten stehen im Einklang mit den Experimenten von Pesiridis und Kollegen, die eine Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen pICln und dem SmD3-SmB-Dimer von 160 ± 40 nM ermittelten [67].

Für einen exakten Vergleich sollten in beiden Fällen die Sm-Proteine jeweils als Ligand an die Chip-Oberfläche gekoppelt und pICln als Analyt eingesetzt werden. Dazu muss die Bindung von SmG als Ligand optimiert werden. Auf diese Weise kann zudem auf ein GST-Fusionsprotein verzichtet werden, da der niedrige isoelektrische Punkt von pICln, eingesetzt als Analyt, irrelevant ist. Darüber hinaus sollten in weiteren SPR-Messungen die Dissoziationskonstanten für die Interaktionen zwischen pICln und den Sm-Proteinen D1 und D3 ermittelt werden. Zum einen um die Ergebnisse der Interaktionsstudien zu überprüfen und zum anderen um die Bindungsaffinitäten der vier direkten Sm-Protein-Interaktionspartner in Abhängigkeit vom pICln-Phosphorylierungsstatus miteinander vergleichen zu können. Des Weiteren könnte mithilfe der SPR-Methode die Zusammensetzung des 6S-Komplexes stufenweise analysiert werden, um die genaue Anordnung der Sm-Proteine D2, E und F im 6S-Ring zu ergründen.

Der Einfluss der ULK1-bedingten pICln-Phosphorylierung auf die Bindung der Sm-Proteine an pICln wurde *in vivo* ebenfalls gezeigt. Eine quantitative Analyse der mit pICln co-präzipitierten Sm-Proteine in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus erfolgte mittels Massenspektrometrie. Der 6S-Komplex wurde mit der phosphorylierungsimitierenden Aspartat-Mutante in deutlich geringerer Menge co-präzipitiert als mit dem wildtypischen Protein. Die Bindung der Sm-Proteine B und D3 hingegen wurde nicht beeinflusst (Abbildung 24 a). Dies bestätigt die Daten des *in vitro*-Interaktionsexperiments bezüglich SmB, SmD3 und SmG (Abbildung 22 a, b und d). Da die Öffnung des 6S-Rings zwischen pICln-SmG und nicht zwischen pICln-SmD1 erfolgt, zeigt die

phosphorylierungsimitierende Aspartat-Mutante im *in vitro*-Interaktionsexperiment keinen Einfluss auf die Bindung mit SmD1 (Abbildung 22 c). Die ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln reguliert demnach offenbar die Stabilität des 6S-Komplexes, der Subkomplex mit SmB/D3 hingegen ist nicht beeinflusst. Bestätigt wird diese Annahme durch die Analyse der 6S-Komplex-beinhaltenden Sm-Proteine D1, D2, F, E und G nach Inhibition von ULK1. In der Größenausschlusschromatographie zeigten Inhibitor-behandelte Zellen eine Anreicherung des 6S-Komplexes im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 24 b und c). Da der verwendete Inhibitor MRT67307 neben ULK1 auch ULK2 inhibiert [202], ist die potenzielle Funktionsübernahme durch ULK2 ebenfalls blockiert.

Im Rahmen der U-snRNP-Biogenese scheint das Methylosom *in vivo* mit allen Sm-Proteinen zu interagieren und den so genannten 20S-Komplex zu bilden [70]. Der aus pICln und SmB/D3 bestehende Subkomplex konnte bisher nur *in vitro* gezeigt werden. Eventuell kann er *in vivo* nicht detektiert werden, da er entweder kurzlebig ist oder stabil gebunden an den PRMT5-Komplex bleibt [70]. Die 6S-Struktur hingegen kann *in vivo* als ein unabhängig vom Methylosom vorliegender Komplex beschrieben werden (Abbildung 24 b und c) [70]. Die Daten dieser Arbeit weisen allerdings darauf hin, dass ein Teil des 6S-Komplexes gebunden an das Methylosom vorliegt, da ULK1 den PRMT5-Komplex bindet, pICln phosphoryliert und dadurch dessen Bindung zu SmG stört. Denkbar wäre, dass der 6S-Komplex sowohl gebunden an das Methylosom vorliegt als auch getrennt von diesem existiert. In diesem Modell bildet der 6S-Komplex eine Art Zwischenprodukt der U-snRNP-Biogenese. Er dient der Speicherung der Sm-Proteine für den weiteren Syntheseweg und nimmt möglicherweise eine Qualitätskontrollfunktion ein, indem er die Aggregation von Sm-Proteinen mit inkorrekturer U-snRNA verhindert [216]. Die Sm-Proteine können die U-snRNA nachweislich nur dann spezifisch binden, wenn sie vorher auf den SMN-Komplex übertragen wurden. Diese Übertragung wird durch die 6S-Struktur verhindert [70, 216]. Eventuell binden sowohl ULK1 als auch der 6S-Komplex erst dann an das Methylosom, wenn neue U-snRNPs für die Bildung des Spleißosoms benötigt werden. ULK1 phosphoryliert daraufhin pICln und sorgt so für die Öffnung des 6S-Rings. Anschließend werden die Sm-Proteine auf den SMN-Komplex übertragen und dieser katalysiert die Bindung an die U-snRNA (Abbildung 29). Zu welchem Zeitpunkt die Methylierung der Sm-Proteine stattfindet, ist unklar. Möglicherweise erfolgt sie im Zuge der Phosphorylierung von pICln durch ULK1 oder vorher im Rahmen der Zusammensetzung des 6S-Komplexes.

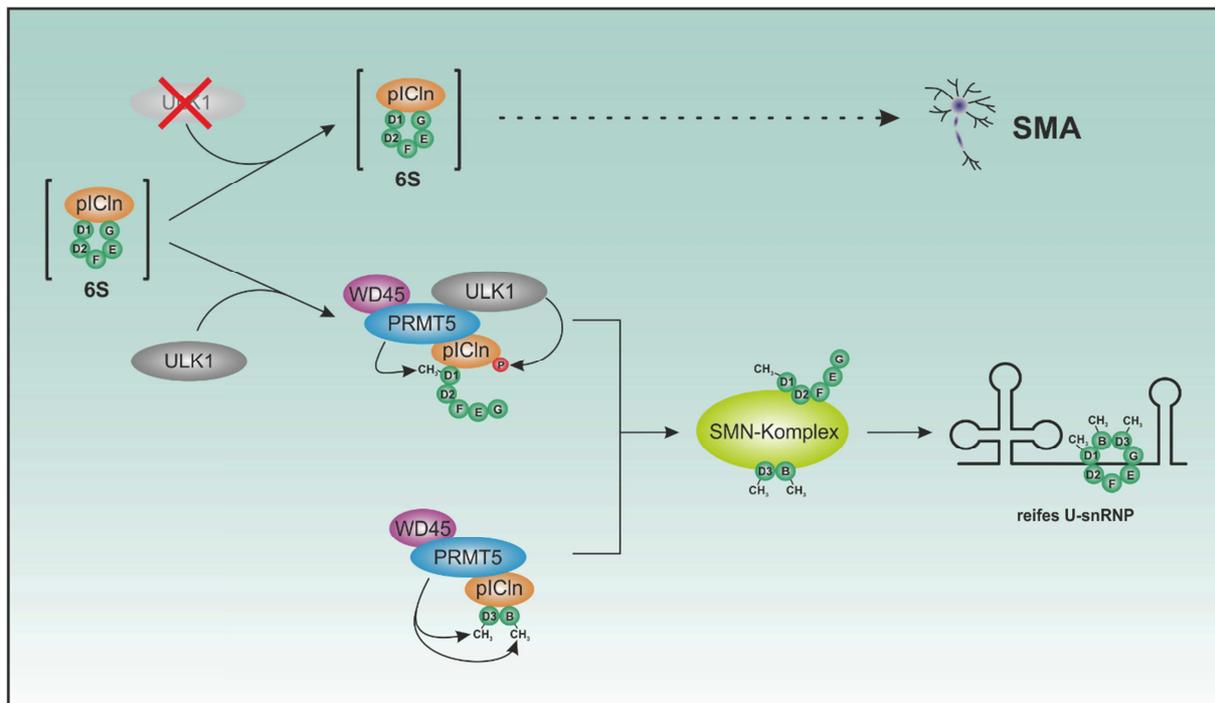


Abbildung 29: ULK1 als Schlüsselregulator in der U-snRNP-Biogenese. Der 6S-Komplex könnte ein Zwischenprodukt der U-snRNP-Biogenese darstellen und der Speicherung der Sm-Proteine D1/D2/F/E/G dienen [216]. Werden neue U-snRNPs für die Bildung des Spleißosoms benötigt, binden möglicherweise sowohl die Serin/Threonin-Kinase ULK1 als auch der 6S-Komplex an das Methylosom. ULK1 phosphoryliert daraufhin pICln und sorgt so für die Öffnung des 6S-Rings. Anschließend werden die Sm-Proteine auf den SMN-Komplex übertragen und dieser katalysiert die Bindung an die U-snRNA. Das Fehlen bzw. die Inhibition von ULK1 führt zu einer Anreicherung der 6S-Struktur. Dies könnte neben dem Verlust von SMN eine weitere Ursache für die spinale Muskelatrophie (SMA) darstellen.

Wie die stabile 6S-Struktur aufgelöst wird, war bislang nicht bekannt. Viele Hypothesen konzentrieren sich auf den SMN-Komplex als entscheidenden Faktor für diese Reaktion. Er tritt mit der äußeren Oberfläche des 6S-Komplexes in Kontakt [70], wobei die Methylierung der Sm-Proteine diese Reaktion unterstützt [82, 83]. Darüber hinaus wird die gesamte Synthesereaktion durch Phosphorylierungen reguliert (vgl. 2.2.1.1). Vor allem die Lokalisation und Funktion des SMN-Komplexes ist abhängig von dieser posttranslationalen Modifikation [81, 85]. Alle Komponenten des SMN-Komplexes sind Phosphoproteine, insbesondere SMN mit 23 und GEMIN3 mit 43 Phosphorylierungsstellen [36]. Beide Proteine liegen im Cytoplasma, dem Ort der U-snRNP-Biogenese, hoch phosphoryliert und im Kern wenig phosphoryliert vor [36, 81, 217]. Husedzinovic und Kollegen identifizierten acht Serine und vier Threonine, welche überwiegend im N-terminalen Bereich von SMN lokalisiert und für die intrazelluläre Verteilung des Proteins verantwortlich sind [217]. Das *assembly chaperone* pICln als entscheidender Regulator der U-snRNP-Biogenese ist ebenfalls ein Phosphoprotein, es wird *in vivo* an insgesamt 19 Positionen phosphoryliert [36]. Allerdings waren bislang weder die entsprechende Kinase noch die Rolle dieser posttranslationalen Modifikationen im Zusammenhang mit der U-snRNP-Biogenese bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit ULK1 die gesuchte Kinase identifiziert und zudem die physiologische Relevanz der

Phosphorylierung geklärt werden.

Da die ULK1-bedingte Phosphorylierung von pICln die Auflösung des 6S-Komplexes initiiert und somit die U-snRNP-Biogenese steuert, wurde zudem der Einfluss auf die Aktivität des Spleißosoms untersucht. Die Verwendung des ULK1/2-Inhibitors MRT67307 sorgte in HEK293T-Zellen für eine deutliche Reduktion der Spleißaktivität (Abbildung 25). Dies trifft sowohl auf die endogene U1-Spleißaktivität (D1-Spleißstelle) als auch die Spleißaktivität neu synthetisierter snRNPs (U1 6A) zu. Die Inhibition von ULK1 sorgt für eine reduzierte Phosphorylierung von pICln und führt somit zu einer Hemmung der U-snRNP-Biogenese. Dies resultiert in einer Reduktion der Neusynthese von U1 6A- und endogenen U1-snRNPs. Die im Vergleich zu unbehandelten Zellen verringerte U-snRNP-Menge ist dementsprechend verantwortlich für die deutlich reduzierte spleißosomale Aktivität. ULK1 hat folglich einen unmittelbaren Einfluss auf die Aktivität der Spleißmaschinerie.

6.5 ULK1 und pICln im Zebrafisch (*D. rerio*)

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine neurodegenerative Erkrankung charakterisiert durch den Untergang der α -Motoneurone im Rückenmark [4]. Ursache ist eine Mutation oder Deletion im *SMN*-Gen [3]. Ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der SMA bietet das transparente Embryo des Zebrafisches (*D. rerio*). Sowohl ein *smn*- als auch *icln*-*Knockdown* führt in den Embryos zu einer Beeinträchtigung des Motoneuronenwachstums, gekennzeichnet durch verkürzte und falsch verzweigte Neurone [205, 206]. Da ULK1 eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung spielt [129-132, 135] und durch Phosphorylierung von pICln die U-snRNP-Biogenese fördert, wurde ein entsprechender *Knockdown* in Zebrafisch-Embryos durchgeführt. Allerdings zeigte dieser keine Neuron-spezifischen Effekte (Abbildung 27). *D. rerio* besitzt zwei verschiedene *ulk1*-Gene: *ulk1a* und *ulk1b*. Diese besitzen zudem jeweils vier bzw. zwei verschiedene Isoformen (Tabelle 3). Die verwendeten Morpholino-Oligos sind gegen die N-Termini von Ulk1a bzw. Ulk1b gerichtet und binden bezüglich Ulk1b beide Isoformen, bezüglich Ulk1a drei der vier Isoformen. Da der Ulk1a-Isoform F1R9T2 der N-Terminus fehlt, kann der verwendete Morpholino nicht binden. In weiteren Experimenten sollten daher zum einen passende Morpholinos gegen alle vier Ulk1a-Isoformen generiert und eingesetzt und zum anderen deutlich mehr Embryos mikroskopisch untersucht werden. Möglicherweise ist zudem ein *Knockdown* nicht ausreichend, um entsprechende Effekte herbeizuführen. Mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems könnte alternativ ein *ulk1*-*Knockout* generiert werden.

Die sequenziellen Unterschiede zwischen humanem ULK1 und den Ulk1-Formen im Zebrafisch sind zudem sehr vielfältig. Zwei Isoformen von Ulk1a zeigen eine Homologie von ca. 50 % mit humanem ULK1, wohingegen die Homologie der beiden anderen Isoformen bei ca. 20-25 % liegt. Hinsichtlich Ulk1b ist eine Isoform zu ca. 60 % identisch mit humanem ULK1, die andere Isoform zu ca. 20 % (Tabelle 3). Eventuell übernimmt nur eine der Isoformen die Funktion von humanem ULK1 in der U-snRNP-Biogenese im Zebrafisch. Dies könnte möglicherweise die zum eingesetzten Morpholino nicht komplementäre Ulk1a-Isoform F1R9T2 sein. Allerdings liegt die Homologie mit humanem ULK1 nur bei ca. 25 % (Tabelle 3). Ebenso wie der Mensch besitzt *D. rerio* weitere Ulk-Proteine. Es sind Orthologe sowohl zu ULK2 (zu 74 % homolog), ULK3 (zu 71 % homolog), ULK4 (zu 54 % homolog) als auch STK36 (zu 30 % homolog) vorhanden (gemäß Alignments mittels *EMBOSS Needle* [201]). Gegebenenfalls haben Ulk1 und Ulk2 auch im Zebrafisch gleichwertige Funktionen, so dass bei Abwesenheit von Ulk1 durch einen *Knockdown*, Ulk2 diese entsprechend übernehmen kann. Bezüglich des SMN-Komplexes besitzt der Zebrafisch sowohl Smn als auch die Gemine 2, 4, 5, 6, 7 und 8. Unrip- und GEMIN3-Orthologe hingegen sind nicht vorhanden. Des Weiteren existieren Orthologe von PRMT5 und den sieben Sm-Proteinen. Der genaue Mechanismus der U-snRNP-Biogenese im Zebrafisch ist bislang nicht bekannt. Möglicherweise unterscheidet sich die Funktionsweise deutlich von der im Menschen und Ulk1 spielt eventuell keine Rolle in dem System. Die teilweise fehlenden Orthologe des SMN-Komplexes und die sequenziellen Unterschiede zu ULK1 unterstützen diese Annahme. Die genauen Zusammenhänge gilt es in zukünftigen Experimenten aufzuklären.

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* dient als ein weiteres Modell zur Untersuchung des motorischen Systems. Borg und Kollegen zeigten, dass die Störung von pICln, ähnlich wie SMN und Gemin2, zu Beeinträchtigungen der neuromuskulären Aktivität führt [218, 219]. Allerdings sind die Homologien bezüglich humanem ULK1 und pICln im Vergleich zum Zebrafisch gemäß Alignment mittels *EMBOSS Needle* [201] deutlich geringer (ULK1: ca. 33 %, pICln: ca. 26 %, vgl. Tabelle 3 und Abbildung 26). Somit bietet die Fruchtfliege keine besonders attraktive Alternative zur Untersuchung des U-snRNP-Systems im Zusammenhang mit der ULK1-abhängigen Phosphorylierung von pICln.

Die Maus hingegen ist für eine entsprechende Analyse deutlich besser geeignet, vor allem im Kontext mit der spinalen Muskelatrophie. In Maus und Mensch sind die Komponenten und die Organisation des Nervensystems hoch konserviert [220]. Murines und humanes pICln sind zu ca. 90 % identisch, murines und humanes ULK1 zu ca. 89 % (gemäß Alignments mittels *EMBOSS Needle* [201]). Bezüglich SMN liegt die Homologie bei ca. 82 % (gemäß Alignments mittels *EMBOSS Needle* [201]), wobei der Mensch über zwei Kopien des *SMN*-Gens verfügt. Die Maus hingegen besitzt nur ein Gen [220]. Nicht

nur im Menschen, sondern auch in der Maus ist der Verlust von *SMN* letal [220]. Es gibt sowohl Ulk1- als auch Ulk2-*Knockout*-Mäuse [221, 222]. Wang und Kollegen zeigten Ende des vergangenen Jahres, dass Ulk1/2-Doppel-*Knockout*-Mäuse Defekte in der axonalen Elongation aufweisen [223]. Mithilfe dieser Modelle könnten zum einen Phosphorylierungsanalysen hinsichtlich pICln und zum anderen die spleißosomale Aktivität im Vergleich zu wildtypischen Mäusen untersucht werden. Darüber hinaus existieren mehrere etablierte SMA-Mausmodelle, welche die verschiedenen Typen der Erkrankung in Abhängigkeit des exogen exprimierten hSMN2-Levels widerspiegeln [220]. Phänotypisch zeigen SMA-Mäuse identisch zum humanen SMA-Phänotyp eine Reduktion der motorischen Funktionen und den Verlust von Motoneuronen [220]. Ouyang und Kollegen entwickelten Anfang 2017 einen ULK1-Aktivator, ein *small molecule*, welches Autophagie-assoziierten Zelltod induzieren kann [224]. Möglicherweise könnte die Injektion bzw. Gabe dieses oder eines anderen ULK1-Aktivators durch die daraus resultierende erhöhte pICln-Phosphorylierung und die damit verbundene Stimulation der U-snRNP-Biogenese den SMA-Phänotyp verringern.

6.6 Abschlussdiskussion und Ausblick

Die vorliegende Dissertation identifizierte die Serin/Threonin-Kinase ULK1 als einen entscheidenden Regulator bzw. Stimulator der U-snRNP-Biogenese. ULK1 interagiert zum einen mit dem PRMT5-Komplex und phosphoryliert darüber hinaus die Serine 193, 195 und 197 im C-Terminus von pICln. Die Phosphorylierung durch ULK1 sorgt für die Öffnung des 6S-Rings zwischen pICln und SmG und ist somit die seit längerem gesuchte Kinase, welche die *kinetic trap* der U-snRNP-Biogenese [70] auflösen kann. Das Fehlen bzw. die Inhibition von ULK1 führt zu einer Anreicherung der 6S-Struktur und somit zu einer Hemmung des weiteren Biogenese-Prozesses. Dies könnte neben dem Verlust von SMN eine weitere Ursache für die spinale Muskelatrophie darstellen (Abbildung 29).

Weiterführende Experimente sollten hinsichtlich der Regulation von ULK1 in diesem Zusammenhang durchgeführt werden. Denkbar ist, dass mTOR neben der Autophagie, ULK1 auch in diesem Signalweg durch Phosphorylierung reguliert. Hinweise darauf sind, dass mTOR unter anderem ebenfalls in die Neuronenentwicklung involviert ist [225] und dass ULK1 53 potenzielle mTOR-abhängige Phosphorylierungsstellen trägt (*Kinexus Phosphonet*). Die Aktivierung von mTOR kann beispielsweise den neuronalen Zelltod, verursacht durch den Verlust von Pals1 (Regulator der Schwannschen Zellen), reduzieren [226]. Eine Inhibition von mTOR-antagonisierenden Phosphatasen führt in SMN-defizienten Maus-Motoneuronen darüber hinaus zu einer erhöhten axonalen Elongation [227]. Wie genau mTOR die neuronale Differenzierung reguliert, ist bislang jedoch wenig verstanden [225]. Bezüglich des in der SMA reduzierten Phosphoproteins SMN stellt mTOR zudem

eine potenzielle Kinase für mehrere Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen dar (*Kinexus Phosphonet*) [36]. Eventuell reguliert mTOR neben ULK1 überdies SMN durch Phosphorylierung.

Die Rolle von pICln in neurodegenerativen Erkrankungen und ULK1 in der neuronalen Differenzierung bzw. axonalen Elongation und die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion im Zusammenhang mit der U-snRNP-Biogenese macht beide Proteine zu vielversprechenden Ansatzpunkten für neue Therapiekonzepte bezüglich SMA und anderer motoneuronaler Erkrankungen wie beispielsweise der amyotrophen Lateralsklerose (ALS). In zukünftigen Experimenten sollten die Folgen von Veränderungen der ULK1-Aktivität in neuronalen Zelllinien oder SMA-Mäusen getestet werden. Eventuell könnte die Aktivierung von ULK1 einen positiven Effekt auf den SMA-Phänotypen haben. Diese Arbeit bietet demnach ein Fundament für die Erforschung neuer Behandlungsoptionen motoneuronaler Erkrankungen, insbesondere der spinalen Muskelatrophie.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. McDonald, C.M., *Clinical approach to the diagnostic evaluation of hereditary and acquired neuromuscular diseases*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2012. **23**(3): p. 495-563.
2. Swash, M. and M.S. Schwartz, *Neuromuscular diseases : a practical approach to diagnosis and management*. 3rd ed. 1997, London ; New York: Springer. xviii, 541 p.
3. Lefebvre, S., et al., *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene*. Cell, 1995. **80**(1): p. 155-65.
4. Tisdale, S. and L. Pellizzoni, *Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy*. J Neurosci, 2015. **35**(23): p. 8691-700.
5. Zhou, J., X. Zheng, and H. Shen, *Targeting RNA-splicing for SMA treatment*. Mol Cells, 2012. **33**(3): p. 223-8.
6. Eggert, C., et al., *Spinal muscular atrophy: the RNP connection*. Trends Mol Med, 2006. **12**(3): p. 113-21.
7. Burnett, B.G., et al., *Regulation of SMN protein stability*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1107-15.
8. Harada, Y., et al., *Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity*. J Neurol, 2002. **249**(9): p. 1211-9.
9. Cheever, T.R., E.A. Olson, and J.M. Ervasti, *Axonal regeneration and neuronal function are preserved in motor neurons lacking ss-actin in vivo*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17768.
10. Pellizzoni, L., et al., *A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing*. Cell, 1998. **95**(5): p. 615-24.
11. Gabanella, F., et al., *Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e921.
12. See, K., et al., *SMN deficiency alters Nrnx2 expression and splicing in zebrafish and mouse models of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(7): p. 1754-70.
13. Sleigh, J.N., et al., *Chondrolectin affects cell survival and neuronal outgrowth in in vitro and in vivo models of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(4): p. 855-69.
14. Hakim, N.H., et al., *Neuron-specific splicing*. Biosci Trends, 2017. **11**(1): p. 16-22.
15. Baumer, D., et al., *Alternative splicing events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy*. PLoS Genet, 2009. **5**(12): p. e1000773.
16. Tu, W.Y., et al., *Spinal muscular atrophy: Factors that modulate motor neurone vulnerability*. Neurobiol Dis, 2017. **102**: p. 11-20.
17. Wan, L. and G. Dreyfuss, *Splicing-Correcting Therapy for SMA*. Cell, 2017. **170**(1): p. 5.
18. Hua, Y., et al., *Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model*. Genes Dev, 2010. **24**(15): p. 1634-44.
19. Porensky, P.N., et al., *A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(7): p. 1625-38.
20. Matera, A.G. and Z. Wang, *A day in the life of the spliceosome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 108-21.
21. Chow, L.T., et al., *An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA*. Cell, 1977. **12**(1): p. 1-8.
22. Berget, S.M., C. Moore, and P.A. Sharp, *Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(8): p. 3171-5.
23. Patel, A.A. and J.A. Steitz, *Splicing double: insights from the second spliceosome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 960-70.
24. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosome structure and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
25. Burset, M., I.A. Seledtsov, and V.V. Solovyev, *Analysis of canonical and non-canonical splice*

- sites in mammalian genomes*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(21): p. 4364-75.
26. Turunen, J.J., et al., *The significant other: splicing by the minor spliceosome*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(1): p. 61-76.
 27. Hoskins, A.A., et al., *Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes*. Science, 2011. **331**(6022): p. 1289-95.
 28. Tseng, C.K. and S.C. Cheng, *Both catalytic steps of nuclear pre-mRNA splicing are reversible*. Science, 2008. **320**(5884): p. 1782-4.
 29. Yang, F., et al., *Splicing proofreading at 5' splice sites by ATPase Prp28p*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(8): p. 4660-70.
 30. Butcher, S.E., *The spliceosome and its metal ions*. Met Ions Life Sci, 2011. **9**: p. 235-51.
 31. Chen, H.C. and S.C. Cheng, *Functional roles of protein splicing factors*. Bioscience Reports, 2012. **32**(4): p. 345-359.
 32. Wang, Y., et al., *Mechanism of alternative splicing and its regulation*. Biomed Rep, 2015. **3**(2): p. 152-158.
 33. Johnson, J.M., et al., *Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays*. Science, 2003. **302**(5653): p. 2141-4.
 34. Valadkhan, S., et al., *Protein-free small nuclear RNAs catalyze a two-step splicing reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 11901-6.
 35. Valadkhan, S., et al., *Protein-free spliceosomal snRNAs catalyze a reaction that resembles the first step of splicing*. RNA, 2007. **13**(12): p. 2300-11.
 36. Gruss, O.J., et al., *UsnRNP biogenesis: mechanisms and regulation*. Chromosoma, 2017.
 37. Egloff, S., et al., *Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression*. Science, 2007. **318**(5857): p. 1777-9.
 38. Egloff, S., et al., *The integrator complex recognizes a new double mark on the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 20564-9.
 39. Hung, K.H. and W.E. Stumph, *Regulation of snRNA gene expression by the Drosophila melanogaster small nuclear RNA activating protein complex (DmSNAPc)*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2011. **46**(1): p. 11-26.
 40. Henry, R.W., et al., *SNAP19 mediates the assembly of a functional core promoter complex (SNAPc) shared by RNA polymerases II and III*. Genes Dev, 1998. **12**(17): p. 2664-72.
 41. Pannone, B.K., D. Xue, and S.L. Wolin, *A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts*. EMBO J, 1998. **17**(24): p. 7442-53.
 42. Achsel, T., et al., *A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5789-802.
 43. Ohno, M., et al., *PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation*. Cell, 2000. **101**(2): p. 187-98.
 44. Hebert, M.D., et al., *Coilin methylation regulates nuclear body formation*. Dev Cell, 2002. **3**(3): p. 329-37.
 45. Smith, K.P. and J.B. Lawrence, *Interactions of U2 gene loci and their nuclear transcripts with Cajal (coiled) bodies: evidence for PreU2 within Cajal bodies*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(9): p. 2987-98.
 46. Frey, M.R. and A.G. Matera, *RNA-mediated interaction of Cajal bodies and U2 snRNA genes*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 499-509.
 47. Boulon, S., et al., *PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli*. Mol Cell, 2004. **16**(5): p. 777-87.
 48. Kitao, S., et al., *A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleus*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 487-97.
 49. Meister, G. and U. Fischer, *Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs*. EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5853-63.
 50. Li, D.K., et al., *SMN control of RNP assembly: From post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease*. Semin Cell Dev Biol, 2014.

51. Mouaikel, J., et al., *Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron*. EMBO Rep, 2003. **4**(6): p. 616-22.
52. Fischer, U. and R. Luhrmann, *An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus*. Science, 1990. **249**(4970): p. 786-90.
53. Fischer, U., et al., *Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap*. EMBO J, 1993. **12**(2): p. 573-83.
54. Nestic, D., G. Tanackovic, and A. Kramer, *A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 19): p. 4423-33.
55. Schaffert, N., et al., *RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies*. EMBO J, 2004. **23**(15): p. 3000-9.
56. Sleeman, J.E. and A.I. Lamond, *Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway*. Curr Biol, 1999. **9**(19): p. 1065-74.
57. Sleeman, J.E. and L. Trinkle-Mulcahy, *Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **28C**: p. 76-83.
58. Lamond, A.I. and D.L. Spector, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 605-12.
59. Stanek, D., et al., *Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2534-43.
60. Kambach, C., et al., *Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs*. Cell, 1999. **96**(3): p. 375-87.
61. Raker, V.A., G. Plessel, and R. Luhrmann, *The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro*. EMBO J, 1996. **15**(9): p. 2256-69.
62. Meister, G., et al., *A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 945-9.
63. Meister, G., et al., *Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln*. Current biology : CB, 2001. **11**(24): p. 1990-4.
64. Friesen, W.J., et al., *A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(10): p. 8243-7.
65. Paulmichl, M., et al., *New mammalian chloride channel identified by expression cloning*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 238-41.
66. Krapivinsky, G.B., et al., *Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln*. Cell, 1994. **76**(3): p. 439-48.
67. Pesiridis, G.S., E. Diamond, and G.D. Van Duyne, *Role of pICln in methylation of Sm proteins by PRMT5*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(32): p. 21347-59.
68. Lemmon, M.A., *Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides*. Biochem Soc Symp, 2007(74): p. 81-93.
69. Friesen, W.J., et al., *The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(24): p. 8289-300.
70. Chari, A., et al., *An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs*. Cell, 2008. **135**(3): p. 497-509.
71. Fisher, D.E., et al., *Small nuclear ribonucleoprotein particle assembly in vivo: demonstration of a 6S RNA-free core precursor and posttranslational modification*. Cell, 1985. **42**(3): p. 751-8.
72. Grimm, C., et al., *Structural basis of assembly chaperone-mediated snRNP formation*. Molecular cell, 2013. **49**(4): p. 692-703.
73. Pu, W.T., et al., *pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins*. Molecular and cellular biology, 1999. **19**(6): p. 4113-20.
74. Pellizzoni, L., J. Yong, and G. Dreyfuss, *Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1775-9.
75. Grimmler, M., et al., *Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates*

- with the cytosolic SMN complex and influences its intracellular localization. *Human molecular genetics*, 2005. **14**(20): p. 3099-111.
76. Tripsianes, K., et al., *Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(12): p. 1414-20.
 77. Ma, Y., et al., *The Gemin6-Gemin7 heterodimer from the survival of motor neurons complex has an Sm protein-like structure*. *Structure*, 2005. **13**(6): p. 883-92.
 78. Battle, D.J., et al., *The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs*. *Mol Cell*, 2006. **23**(2): p. 273-9.
 79. Zhang, R., et al., *Structure of a key intermediate of the SMN complex reveals Gemin2's crucial function in snRNP assembly*. *Cell*, 2011. **146**(3): p. 384-95.
 80. Yong, J., et al., *Gemin5 delivers snRNA precursors to the SMN complex for snRNP biogenesis*. *Mol Cell*, 2010. **38**(4): p. 551-62.
 81. Grimmler, M., et al., *Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs*. *EMBO reports*, 2005. **6**(1): p. 70-6.
 82. Brahm, H., et al., *Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein*. *RNA*, 2001. **7**(11): p. 1531-42.
 83. Friesen, W.J., et al., *SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets*. *Mol Cell*, 2001. **7**(5): p. 1111-7.
 84. Boisvert, F.M., et al., *Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing*. *J Cell Biol*, 2002. **159**(6): p. 957-69.
 85. Petri, S., et al., *Dephosphorylation of survival motor neurons (SMN) by PPM1G/PP2Cgamma governs Cajal body localization and stability of the SMN complex*. *The Journal of cell biology*, 2007. **179**(3): p. 451-65.
 86. Walsh, C.T., S. Garneau-Tsodikova, and G.J. Gatto, Jr., *Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications*. *Angewandte Chemie*, 2005. **44**(45): p. 7342-72.
 87. Seo, J. and K.J. Lee, *Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches*. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 2004. **37**(1): p. 35-44.
 88. De Las Rivas, J. and C. Fontanillo, *Protein-Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks*. *Plos Computational Biology*, 2010. **6**(6).
 89. Gubit, A.K., W. Feng, and G. Dreyfuss, *The SMN complex*. *Exp Cell Res*, 2004. **296**(1): p. 51-6.
 90. Guderian, G., et al., *RioK1, a new interactor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), competes with pICln for binding and modulates PRMT5 complex composition and substrate specificity*. *The Journal of biological chemistry*, 2011. **286**(3): p. 1976-86.
 91. Duan, G. and D. Walther, *The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks*. *PLoS Comput Biol*, 2015. **11**(2): p. e1004049.
 92. Lu, C.T., et al., *DbPTM 3.0: an informative resource for investigating substrate site specificity and functional association of protein post-translational modifications*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(Database issue): p. D295-305.
 93. Cohen, P., *The origins of protein phosphorylation*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(5): p. E127-30.
 94. Johnson, L.N. and D. Barford, *The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1993. **22**: p. 199-232.
 95. Kyriakis, J.M., *In the beginning, there was protein phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(14): p. 9460-2.
 96. Burnett, G. and E.P. Kennedy, *The enzymatic phosphorylation of proteins*. *J Biol Chem*, 1954. **211**(2): p. 969-80.
 97. Ardito, F., et al., *The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)*. *Int J Mol Med*, 2017. **40**(2): p. 271-280.
 98. Yu, L., et al., *Role of Mg²⁺ ions in protein kinase phosphorylation: insights from molecular dynamics simulations of ATP-kinase complexes*. *Molecular Simulation*, 2011. **37**(14): p. 1143-1150.
 99. Krauss, G., *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 2nd ed. 2000, Weinheim ; New

- York: Wiley-VCH. xxii, 506 p.
100. Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J, 1995. **9**(8): p. 576-96.
 101. Hanks, S.K. and A.M. Quinn, *Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members*. Methods Enzymol, 1991. **200**: p. 38-62.
 102. Johnson, L.N., M.E. Noble, and D.J. Owen, *Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation*. Cell, 1996. **85**(2): p. 149-58.
 103. Berg, J.M., et al., *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York: W.H. Freeman.
 104. Wang, B. and M. Kundu, *Canonical and noncanonical functions of ULK/Atg1*. Curr Opin Cell Biol, 2017. **45**: p. 47-54.
 105. Tsukada, M. and Y. Ohsumi, *Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters, 1993. **333**(1-2): p. 169-74.
 106. Matsuura, A., et al., *Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1997. **192**(2): p. 245-50.
 107. Alers, S., et al., *The incredible ULKs*. Cell communication and signaling : CCS, 2012. **10**(1): p. 7.
 108. Chan, E.Y. and S.A. Tooze, *Evolution of Atg1 function and regulation*. Autophagy, 2009. **5**(6): p. 758-65.
 109. Alers, S., et al., *Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(1): p. 2-11.
 110. Lee, E.J. and C. Tournier, *The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 689-95.
 111. Pyo, J.O., J. Nah, and Y.K. Jung, *Molecules and their functions in autophagy*. Experimental & molecular medicine, 2012. **44**(2): p. 73-80.
 112. Youle, R.J. and D.P. Narendra, *Mechanisms of mitophagy*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011. **12**(1): p. 9-14.
 113. Hosokawa, N., et al., *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy*. Molecular biology of the cell, 2009. **20**(7): p. 1981-91.
 114. Hosokawa, N., et al., *Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13*. Autophagy, 2009. **5**(7): p. 973-9.
 115. Mercer, C.A., A. Kaliappan, and P.B. Dennis, *A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy*. Autophagy, 2009. **5**(5): p. 649-62.
 116. Hara, T. and N. Mizushima, *Role of ULK-FIP200 complex in mammalian autophagy: FIP200, a counterpart of yeast Atg17?* Autophagy, 2009. **5**(1): p. 85-7.
 117. Hara, T., et al., *FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells*. The Journal of cell biology, 2008. **181**(3): p. 497-510.
 118. Chan, E.Y., et al., *Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(1): p. 157-71.
 119. Jung, C.H., et al., *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1992-2003.
 120. Ganley, I.G., et al., *ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 12297-305.
 121. Egan, D.F., et al., *Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy*. Science, 2011. **331**(6016): p. 456-61.
 122. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-41.
 123. Loffler, A.S., et al., *Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 696-706.
 124. Dunlop, E.A., et al., *ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 737-47.
 125. Jung, C.H., et al., *ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation*. Autophagy, 2011. **7**(10): p. 1212-21.

126. Joo, J.H., et al., *The Noncanonical Role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi Trafficking Is Essential for Cellular Homeostasis*. Mol Cell, 2016. **62**(6): p. 982.
127. Joshi, A., et al., *Nuclear ULK1 promotes cell death in response to oxidative stress through PARP1*. Cell Death Differ, 2016. **23**(2): p. 216-30.
128. Kuroyanagi, H., et al., *Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of Caenorhabditis elegans: CDNA cloning, expression, and chromosomal assignment*. Genomics, 1998. **51**(1): p. 76-85.
129. Ogura, K., et al., *Caenorhabditis elegans unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase*. Genes Dev, 1994. **8**(20): p. 2389-400.
130. Tomoda, T., et al., *A mouse serine/threonine kinase homologous to C. elegans UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons*. Neuron, 1999. **24**(4): p. 833-46.
131. Toda, H., et al., *UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly*. Genes Dev, 2008. **22**(23): p. 3292-307.
132. Zhou, X., et al., *Unc-51-like kinase 1/2-mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(14): p. 5842-7.
133. Tomoda, T., et al., *Role of Unc51.1 and its binding partners in CNS axon outgrowth*. Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 541-58.
134. Wang, C.C., R.G. Held, and B.J. Hall, *SynGAP regulates protein synthesis and homeostatic synaptic plasticity in developing cortical networks*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83941.
135. Loh, S.H., et al., *Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 283-98.
136. Maloverjan, A., et al., *Identification of a novel serine/threonine kinase ULK3 as a positive regulator of Hedgehog pathway*. Experimental cell research, 2010. **316**(4): p. 627-37.
137. Maloverjan, A., et al., *Dual Function of UNC-51-like Kinase 3 (Ulk3) in the Sonic Hedgehog Signaling Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(39): p. 30079-30090.
138. Murone, M., et al., *Gli regulation by the opposing activities of Fused and Suppressor of Fused*. Nature Cell Biology, 2000. **2**(5): p. 310-312.
139. Boudeau, J., et al., *Emerging roles of pseudokinases*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(9): p. 443-52.
140. Lang, B., et al., *Recurrent deletions of ULK4 in schizophrenia: a gene crucial for neuritogenesis and neuronal motility*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 3): p. 630-40.
141. Khorasanizadeh, S., *The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation*. Cell, 2004. **116**(2): p. 259-72.
142. Dong, X.J. and Z.P. Weng, *The correlation between histone modifications and gene expression*. Epigenomics, 2013. **5**(2): p. 113-116.
143. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. Molecular cell, 2009. **33**(1): p. 1-13.
144. Chen, T., et al., *N-terminal alpha-methylation of RCC1 is necessary for stable chromatin association and normal mitosis*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(5): p. 596-603.
145. Boriack-Sjodin, P.A. and K.K. Swinger, *Protein Methyltransferases: A Distinct, Diverse, and Dynamic Family of Enzymes*. Biochemistry, 2016. **55**(11): p. 1557-1569.
146. Upadhyay, A.K. and X. Cheng, *Dynamics of histone lysine methylation: structures of methyl writers and erasers*. Prog Drug Res, 2011. **67**: p. 107-24.
147. Chang, B., et al., *JMJD6 is a histone arginine demethylase*. Science, 2007. **318**(5849): p. 444-7.
148. Webby, C.J., et al., *Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing*. Science, 2009. **325**(5936): p. 90-3.
149. Bottger, A., et al., *The oxygenase Jmjd6--a case study in conflicting assignments*. Biochem J, 2015. **468**(2): p. 191-202.
150. Yang, Y. and M.T. Bedford, *Protein arginine methyltransferases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(1): p. 37-50.
151. Boffa, L.C., et al., *Distribution of NG, NG,-dimethylarginine in nuclear protein fractions*.

- Biochem Biophys Res Commun, 1977. **74**(3): p. 969-76.
152. Raman, B., et al., *N(omega)-arginine dimethylation modulates the interaction between a Gly/Arg-rich peptide from human nucleolin and nucleic acids*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(16): p. 3377-84.
153. Klein, S., et al., *Biochemical analysis of the arginine methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(5): p. 3150-7.
154. Gary, J.D. and S. Clarke, *RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 61, 1998. **61**: p. 65-131.
155. Najbauer, J., et al., *Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(14): p. 10501-9.
156. Morales, Y., et al., *Biochemistry and regulation of the protein arginine methyltransferases (PRMTs)*. Arch Biochem Biophys, 2016. **590**: p. 138-152.
157. Lin, W.J., et al., *The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(25): p. 15034-44.
158. Lee, J. and M.T. Bedford, *PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays*. EMBO reports, 2002. **3**(3): p. 268-73.
159. Lee, J., et al., *PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(38): p. 32890-6.
160. Yang, Y., et al., *PRMT9 is a type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAP145*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6428.
161. Pollack, B.P., et al., *The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(44): p. 31531-42.
162. Cook, J.R., et al., *FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(2): p. 472-81.
163. Gonsalvez, G.B., et al., *Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins*. J Cell Biol, 2007. **178**(5): p. 733-40.
164. Zurita-Lopez, C.I., et al., *Human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) is a type III enzyme forming omega-NG-monomethylated arginine residues*. J Biol Chem, 2012. **287**(11): p. 7859-70.
165. Yu, Z., et al., *A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(11): p. 2982-96.
166. Tee, W.W., et al., *Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency*. Genes Dev, 2010. **24**(24): p. 2772-7.
167. Hanukoglu, I., *Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2015. **43**(3): p. 206-209.
168. Low, J.K. and M.R. Wilkins, *Protein arginine methylation in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS J, 2012. **279**(24): p. 4423-43.
169. Jain, K., et al., *Protein Arginine Methyltransferase Product Specificity Is Mediated by Distinct Active-site Architectures*. J Biol Chem, 2016. **291**(35): p. 18299-308.
170. Zhang, X. and X. Cheng, *Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides*. Structure, 2003. **11**(5): p. 509-20.
171. Weiss, V.H., et al., *The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(12): p. 1165-71.
172. Rho, J., et al., *Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(14): p. 11393-401.
173. Buhler, D., et al., *Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(13): p. 2351-7.
174. Branscombe, T.L., et al., *PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of*

- symmetric dimethylarginine residues in proteins*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(35): p. 32971-6.
175. Lacroix, M., et al., *The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5*. EMBO Rep, 2008. **9**(5): p. 452-8.
176. Dacwag, C.S., et al., *The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(1): p. 384-94.
177. Liu, Z., et al., *A putative transcriptional elongation factor hlws1 is essential for mammalian cell proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(1): p. 47-53.
178. Andreu-Perez, P., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 regulates ERK1/2 signal transduction amplitude and cell fate through CRAF*. Sci Signal, 2011. **4**(190): p. ra58.
179. Wei, T.Y., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 is a potential oncoprotein that upregulates G1 cyclins/cyclin-dependent kinases and the phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling cascade*. Cancer Sci, 2012. **103**(9): p. 1640-50.
180. Powers, M.A., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4*. Cancer research, 2011. **71**(16): p. 5579-87.
181. Chung, J., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibition induces lymphoma cell death through reactivation of the retinoblastoma tumor suppressor pathway and polycomb repressor complex 2 (PRC2) silencing*. J Biol Chem, 2013. **288**(49): p. 35534-47.
182. Karkhanis, V., et al., *Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development*. Trends in biochemical sciences, 2011. **36**(12): p. 633-41.
183. Cheng, D., et al., *The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing*. Molecular cell, 2007. **25**(1): p. 71-83.
184. Antonyamy, S., et al., *Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(44): p. 17960-5.
185. Burgos, E.S., et al., *Histone H2A and H4 N-terminal Tails Are Positioned by the MEP50 WD Repeat Protein for Efficient Methylation by the PRMT5 Arginine Methyltransferase*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(15): p. 9674-9689.
186. Xu, C. and J. Min, *Structure and function of WD40 domain proteins*. Protein Cell, 2011. **2**(3): p. 202-14.
187. Liu, F., et al., *JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation*. Cancer cell, 2011. **19**(2): p. 283-94.
188. Pal, S., et al., *Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9630-45.
189. Schmitz, K., *Interaktionsstudie des PRMT5-Komplexes mit dem Autophagie-regulierenden Ulk1-Atg13-FIP200-Komplex*. 2013: Masterarbeit, Institut für Molekulare Medizin I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
190. Erkelenz, S., et al., *Balanced splicing at the Tat-specific HIV-1 3' splice site A3 is critical for HIV-1 replication*. Retrovirology, 2015. **12**: p. 29.
191. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
192. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. Journal of molecular biology, 1975. **94**(3): p. 441-8.
193. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
194. Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder, *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei*. Nucleic acids research, 1983. **11**(5): p. 1475-89.
195. Niewalda, T., et al., *Synapsin determines memory strength after punishment- and relief-learning*. J Neurosci, 2015. **35**(19): p. 7487-502.

196. Dubiel, D., et al., *Cul3 neddylation is crucial for gradual lipid droplet formation during adipogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2017. **1864**(8): p. 1405-1412.
197. MacLean, B., et al., *Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments*. *Bioinformatics*, 2010. **26**(7): p. 966-8.
198. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
199. Mizushima, N., *The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation*. *Current opinion in cell biology*, 2010. **22**(2): p. 132-9.
200. Wallot-Hieke, N., et al., *Systematic analysis of ATG13 domain requirements for autophagy induction*. *Autophagy*, 2017: p. 1-58.
201. Rice, P., I. Longden, and A. Bleasby, *EMBOSS: The European molecular biology open software suite*. *Trends in Genetics*, 2000. **16**(6): p. 276-277.
202. Petherick, K.J., et al., *Pharmacological Inhibition of ULK1 Blocks mTOR-Dependent Autophagy*. *J Biol Chem*, 2015.
203. Miranda, T.B., et al., *Spliceosome Sm proteins D1, D3, and B/B' are asymmetrically dimethylated at arginine residues in the nucleus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **323**(2): p. 382-7.
204. Sendtner, M., *Molecular mechanisms in spinal muscular atrophy: models and perspectives*. *Curr Opin Neurol*, 2001. **14**(5): p. 629-34.
205. Winkler, C., et al., *Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy*. *Genes & development*, 2005. **19**(19): p. 2320-30.
206. McWhorter, M.L., et al., *Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(5): p. 919-31.
207. Summerton, J., et al., *Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and in-cell systems*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1997. **7**(2): p. 63-70.
208. Corpet, F., *Multiple Sequence Alignment with Hierarchical-Clustering*. *Nucleic Acids Research*, 1988. **16**(22): p. 10881-10890.
209. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(2): p. 124-31.
210. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 67-93.
211. Jung, C.H., et al., *mTOR regulation of autophagy*. *FEBS letters*, 2010. **584**(7): p. 1287-95.
212. Rubinsztein, D.C., P. Codogno, and B. Levine, *Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(9): p. 709-30.
213. Wong, P.M., et al., *The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation*. *Autophagy*, 2013. **9**(2): p. 124-37.
214. Williamson, M.P., *The structure and function of proline-rich regions in proteins*. *Biochem J*, 1994. **297 (Pt 2)**: p. 249-60.
215. Hermann, H., et al., *snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions*. *EMBO J*, 1995. **14**(9): p. 2076-88.
216. Chari, A. and U. Fischer, *Cellular strategies for the assembly of molecular machines*. *Trends in biochemical sciences*, 2010. **35**(12): p. 676-83.
217. Husedzinovic, A., et al., *Phosphoregulation of the human SMN complex*. *Eur J Cell Biol*, 2014. **93**(3): p. 106-17.
218. Borg, R.M., et al., *Genetic Interactions between the Members of the SMN-Gemins Complex in Drosophila (vol 10, e0130974, 2015)*. *Plos One*, 2015. **10**(9).
219. Borg, R.M., et al., *Disruption of snRNP biogenesis factors Tgs1 and pCln induces phenotypes that mirror aspects of SMN-Gemins complex perturbation in Drosophila, providing new insights into spinal muscular atrophy*. *Neurobiology of Disease*, 2016. **94**: p. 245-258.
220. Bebee, T.W., C.E. Dominguez, and D.S. Chandler, *Mouse models of SMA: tools for disease characterization and therapeutic development*. *Hum Genet*, 2012. **131**(8): p. 1277-93.
221. Cheong, H., et al., *Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases*. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(27): p. 11121-6.
222. Kundu, M., et al., *Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1493-502.
223. Wang, B., et al., *The Autophagy-Inducing Kinases, ULK1 and ULK2, Regulate Axon Guidance in the Developing Mouse Forebrain via a Noncanonical Pathway*. Autophagy, 2017: p. 0.
224. Ouyang, L., et al., *A small-molecule activator induces ULK1-modulating autophagy-associated cell death in triple negative breast cancer*. Autophagy, 2017. **13**(4): p. 777-778.
225. Bateman, J.M., *Mechanistic insights into the role of mTOR signaling in neuronal differentiation*. Neurogenesis (Austin), 2015. **2**(1): p. e1058684.
226. Kim, S., et al., *The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development*. Neuron, 2010. **66**(1): p. 69-84.
227. Ning, K., et al., *PTEN depletion rescues axonal growth defect and improves survival in SMN-deficient motor neurons*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(16): p. 3159-68.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Genetische Ursache der spinalen Muskelatrophie	10
Abbildung 2: Der Mechanismus des prä-mRNA-Spleißens wird in zwei Spleißreaktionen unterteilt.....	13
Abbildung 3: Cytoplasmatischer Teil der U-snRNP-Biogenese.....	17
Abbildung 4: Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung.....	19
Abbildung 5: Übersicht über die Funktionen von ULK1	21
Abbildung 6: Mechanismen der Protein-Lysin-Methylierung und Protein-Arginin-Methylierung	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung der neun Formen der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT1-9) in Säugetieren	25
Abbildung 8: GAR- und PGM-Motive in den Proteinsequenzen der Sm-Proteine B, D1 und D3	27
Abbildung 9: Struktur des humanen PRMT5-WD45-Heterooktamers.....	28
Abbildung 10: ULK1 interagiert mit dem PRMT5-Komplex unabhängig von EBSS-induzierter Autophagie und von seinem C-Terminus.....	59
Abbildung 11: ULK1 interagiert mit dem PRMT5-Komplex <i>in vivo</i>	60
Abbildung 12: ULK1, ULK2 und ULK3 phosphorylieren pICln	61
Abbildung 13: ULK3 interagiert nicht mit dem PRMT5-Komplex.....	62
Abbildung 14: Charakterisierung der pICln-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung	63
Abbildung 15: Generierung eines stabilen ULK1- <i>Knockdowns</i> in HEK293T-Zellen	65
Abbildung 16: Ein ULK1- <i>Knockdown</i> hat keinen Einfluss auf die Methylosom-Zusammensetzung	66
Abbildung 17: ULK1 phosphoryliert pICln <i>in vivo</i>	67
Abbildung 18: Schematische Darstellung von pICln inklusive der drei sauren Domänen (SD) und der ULK1- abhängigen Serin-Phosphorylierungsstellen an den Positionen 193, 195 und 197	68
Abbildung 19: ULK1 phosphoryliert pICln im C-terminalen Bereich an den Serinen 193, 195 und 197	69
Abbildung 20: ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des PRMT5-Komplexes	70
Abbildung 21: Einfluss von pICln auf die Sm-Protein-Methylierung durch PRMT5	71
Abbildung 22: ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln inhibiert die Interaktion mit SmG.....	73
Abbildung 23: Affinität von pICln zu SmB bzw. SmG in Abhängigkeit vom pICln-Phosphorylierungsstatus.....	75
Abbildung 24: ULK1-abhängige Phosphorylierung von pICln beeinflusst die Stabilität des 6S-Komplexes.....	77
Abbildung 25: Eine Inhibition von ULK1 reduziert die spleißosomale Aktivität.....	79
Abbildung 26: Sequenzvergleich des humanen pICln mit den vier icln-Formen des Zebrafisches	81
Abbildung 27: ULK1- <i>Knockdown</i> in <i>D. rerio</i> -Embryos zeigt keinen Effekt auf die Motoneuronenentwicklung ...	82
Abbildung 28: SmD1-Proteinsequenz inklusive der Sm-Motive 1 und 2 und der RG-Domäne.....	88
Abbildung 29: ULK1 als Schlüsselregulator in der U-snRNP-Biogenese	92

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vergleich der ULK1-Sequenz mit den Sequenzen von ULK2, ULK3, ULK4 und STK36 hinsichtlich der Protein-Gesamtlänge und der Kinase-Domäne. Alignments mithilfe <i>EMBOSS Needle</i> durchgeführt [201].	61
Tabelle 2: ULK1-, ULK2- und ULK3-abhängige Phosphorylierungsstellen in pICln. Phosphorylierungsstellen mit einem Score > 90 % (ausgewertet mit PhosphoRS) und einer posterioren Fehlerwahrscheinlichkeit (PFW) < 0,005 (modifizierter t-Test, PEAKS Studio 7.0) wurden als sicher eingestuft.	68
Tabelle 3: Sequenzielle Homologien zwischen humanem ULK1 (hULK1) und den Ulk1a- bzw. Ulk1b-Isoformen des Zebrafisches. Alignments mithilfe <i>EMBOSS Needle</i> [201] durchgeführt.	80

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADMA	Omega-N ^G , N ^G -Dimethylarginin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AS	Amidoschwarz-Färbung
ATG	<i>autophagy related gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AR	Autoradiographie
bp	<i>base pair</i>
CF	Coomassie-Färbung
CORPS	<i>coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator</i>
CTD	C-terminale Domäne
kDa	Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESE	<i>exonic splicing enhancers</i>
ESS	<i>exonic splicing silencers</i>
EZ	Expositionszeit
FCS	Fötale Kälberserum
FIP200	<i>focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa</i>
FRET	Förster-Resonanzenergie-Transfer
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAR	Glycin- und Arginin-reich
GEMIN	<i>gem-associated protein</i>
Gems	<i>Gemini of cajal bodies</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	human
IF	Immunfluoreszenzfärbung
ISE	<i>intronic splicing enhancers</i>
ISS	<i>intronic splicing silencers</i>
JMJD6	<i>Jumonji domain-containing 6</i>

kb	<i>kilo base</i>
K _d	Dissoziationskonstante
LC-MS	<i>liquid chromatography–mass spectrometry</i>
M	Molar
MDa	Megadalton
MMA	Omega-N ^G -Monomethylarginin
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
MO	Morpholino
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTase	Methyltransferase
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
pA	Poly-A-Signal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PGM	Prolin-Glycin-und-Methionin-reich
PH	Pleckstrin-homolog
pICln	<i>chloride conductance regulatory protein ICln</i>
PKMT	Protein-Lysin-Methyltransferase
PMT	Protein-Methyltransferase
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PTM	posttranslationale Modifikation
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RU	Resonanz-Unit
S	Svedberg-Einheit
S100	Cytoplasma-Extrakt
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SAH	S-Adenosylhomocystein
SDMA	Omega-N ^G ,N ^{'G} -Dimethylarginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SF	Silberfärbung

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN	<i>survival motor neuron</i>
SNAPc	snRNA-aktivierender Proteinkomplex
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
SPN	Snurportin
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
SRE	regulatorische Spleißelemente
TFA	Trifluoressigsäure
TGS1	Trimethylguanosin-Synthase 1
THW	Threonin-Histidin-Tryptophan
TMG	2,2,7-Trimethylguanosinstruktur
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	<i>Unit</i>
ULK	<i>Unc-51-like kinase 1</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WD45	Methylsom Protein 50

11 PUBLIKATIONEN

Nora Hieke, Antje S. Löffler, Takeshi Kaizuka, Niklas Berleth, Philip Böhler, Stefan Drießen, Fabian Stuhldreier, Olena Friesen, Kaivon Assani, Katharina Schmitz, Christoph Peter, Britta Diedrich, Jörn Dengjel, Petter Holland, Anne Simonsen, Sebastian Wesselborg, Noboru Mizushima, Björn Stork, *Expression of a ULK1/2 binding-deficient ATG13 variant can partially restore autophagic activity in ATG13-deficient cells*. *Autophagy*, 2015. **11**(9): p. 1471-83.

12 DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich Christoph für seine fantastische Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Du warst zu jeder Zeit und für jede Art von Frage oder Problem für mich da. Nachdem alle wissenschaftlichen Thesen und Gedanken ausführlich diskutiert wurden, folgten interessante Diskurse über Geldanlagen jeglicher Art oder die Wichtigkeit der technischen Dienste bezüglich Autos und Fahrräder. Ich danke dir für die tolle Zeit und vor allem deine persönliche Unterstützung im Umgang mit allen nebensächlichen aber doch sehr wichtigen Angelegenheiten!

Selbstverständlich danke ich Prof. Sebastian Wesselborg für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Institut anfertigen zu dürfen und für seine ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Prof. Henrike Heise gilt mein Dank für die Übernahme des Gutachtens seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Cordula und Jan danke ich für die entspannten Mittagspausen im Sozialraum, in denen immer wieder interessante und besondere Aspekte des Lebens zum Thema wurden. Jan, dir danke ich darüber hinaus für dein immer offenes Ohr, egal ob wissenschaftlich oder privat. Cordula, du bist eine richtig gute Freundin für mich geworden!

Des Weiteren gebührt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe der Molekularen Medizin I und der Molekularen Radioonkologie. Ihr habt mir oft mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Es hat mir sehr viel Freude bereitet mit euch zu arbeiten, zu lachen und zu diskutieren. Ihr habt es geschafft, mir auch in schlechten Momenten immer wieder ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern.

Meinen Eltern und meiner Schwester bin ich ganz besonders dankbar. Ihr habt mich stets unterstützt und immer an mich geglaubt. Ebenso danke ich meinen Freunden: ihr habt für die nötige Ablenkung und so manch unvergesslichen Abend gesorgt.

Mein größter Dank geht an Alex und unsere kleine Tochter. Maja, du munterst mich mit einem freudenstrahlenden „Hallo Mama“ so sehr auf, dass jede Sorge vergessen ist. Alex, mit dir habe ich das Gefühl jede Hürde des Lebens meistern zu können. Du hast die Fähigkeit mich Dinge aus einem anderen Blickwinkel sehen zu lassen, wodurch große Probleme auf einmal ganz klein werden. Ich bin unendlich dankbar euch beide zu haben!

13 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Katharina Schmitz
Geburtsdatum/-ort: 11. November 1984, in Neuss

Schulischer Werdegang

08/1991–08/1995 Leo-Schule, Neuss
08/1995–06/2004 Marie-Curie-Gymnasium, Neuss
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

08/2004–01/2007 Ausbildung zur Bürokauffrau
Janssen-Cilag GmbH, Neuss

Beruflicher Werdegang

01/2007–12/2007 Sekretärin im Bereich Produktmanagement Psychiatrie
Janssen-Cilag GmbH, Neuss

Universitäre Ausbildung

10/2008–09/2011 Bachelorstudium der Biologie (B.Sc.)
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Bachelorarbeit am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bei Prof. Hartmut Hengel
Thema: „Generierung von TNF- α -Reporterzellen“

10/2011–08/2013 Masterstudium der Biologie (M. Sc.)
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Masterarbeit am Institut für Molekulare Medizin I des Universitätsklinikums Düsseldorf bei Prof. Sebastian Wesselborg
Thema: „Interaktionsstudie des PRMT5-Komplexes mit dem Autophagie-regulierenden Ulk1-Atg13-FIP200-Komplex“

seit 09/2013 Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Molekulare Medizin I des Universitätsklinikums Düsseldorf bei Prof. Sebastian Wesselborg

10/2015–10/2016 Elternzeit
Thema: „Die regulatorische Funktion von ULK1 in der humanen U-snRNP-Biogenese“